

- больных бронхиальной астмой // Российский алергологический журнал. – 2015. – № 2. – С.37-46.
7. Hogan C., Denning D.W. Allergic bronchopulmonary aspergillosis and related allergic syndromes // Semin. Respir. Crit. Care Med. – 2011. – Vol. 32, №6. – P.682-692.
8. Agarwal R.A., Chakrabarti A., Shah D. et al. For the ABPA complicating asthma ISHAM working group 2013. Allergic bronchopulmonary aspergillosis: review of literature and proposal of new diagnostic and classification criteria // Clinical & Experimental Allergy – 2013. – Vol. 43. – P.850-873.

ФАГОЦИТАРНАЯ АКТИВНОСТЬ МОНОЦИТОВ КРОВИ В ОТВЕТ НА МЕТИЦИЛЛИНРЕЗИСТЕНТНЫЕ ШТАММЫ *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* У БОЛЬНЫХ ПОЛИПОЗНЫМ РИНОСИНУСИТОМ

Коленчукова О.А.^{1,2}, Лазарева А.М.¹, Смирнова С.В.¹, Сарматова Н.И.², Добрецов К.Г.³

¹ «Научно-исследовательский институт медицинских проблем Севера» обособленное подразделение ФИЦ КНЦ СО РАН;

² Институт биологии и биотехнологии Сибирского федерального университета Минобрнауки РФ;

³ Центр оториноларингологии ФГБУ Федеральный Сибирский научно-клинический центр ФМБА России;

Полипозный риносинусит – это хроническое заболевание слизистой оболочки носа и околоносовых пазух, имеющее в основе патогенеза воспалительную реакцию, в которой в зависимости от формы воспаления могут доминировать эозинофилы или нейтрофилы [1]. Распространенность его в популяции достаточно велика. Колонизация золотистого стафилококка на слизистой оболочке носа приводит к образованию суперантигенного токсина, который усиливает местное эозинофильное воспаление и образование полипов [1,2,3]. Метициллинрезистентный стафилококк (MRSA) относится к бета-лактамазам расширенного спектра. Наиболее часто именно с ним связаны внутрибольничные (нозокомиальные) инфекции [4]. Известно, что уровень летальности при бактериемиях, вызываемых MRSA, выше, чем при инфекциях, обусловленных чувствительными штаммами. Вместе с тем установлено, что в процессе эволюции стафилококки приобрели способность к угнетению фагоцитарной функции лейкоцитов крови путем блокирования опсонизирующих веществ (комплемента и иммуноглобулина G), а также путем непосредственного токсического действия на фагоциты [5, 6, 7].

Фагоцитоз является одной из главных систем защиты организма от чужеродных агентов и играет важную роль при гнойно-воспалительных заболеваниях, особенно при стафилококковой инфекции. Активированные моноциты являются мощными эффекторами и запускают механизмы каскадных реакций, обеспечивающих развитие воспаления. Моноциты первыми мобилизуются в очаг воспаления и, от их фагоцитарной активности зависит элиминация возбудителя [1, 2, 3].

Несмотря на интенсивность исследований в данном направлении, остается все еще малоизученным весь спектр, происходящий внутриклеточных событий, связанных с изменением фенотипических характеристик и функционирования моноцитов при воздействии бактериальных агентов, в том числе чувствительных и резистентных к действию антибиотиков.

Целью исследования является оценка фагоцитарной активности моноцитов крови при воздействии метициллинрезистентных штаммов *Staphylococcus aureus* относительно чувствительных штаммов у больных полипозным риносинуситом.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектами исследования служили моноциты крови, выделенные у больных полипозным

риносинуситом в возрасте от 25 до 45 лет (n=38) и штаммы *Staphylococcus aureus* устойчивые к действию оксациллина (метициллина) (MRSA) в виде живой суспензии в концентрации 10^6 КОЕ/мл. В качестве контроля использовались штаммы *Staphylococcus aureus* чувствительные к действию метициллина (MSSA) в аналогичной концентрации.

Для выявления метициллинрезистентности *Staphylococcus aureus* использовали метод скрининга на агаре. Для проведения скрининга использовали агар Мюллера-Хинтон, содержащий 4% NaCl и 6,0 мкг/мл метициллина.

Микробную взвесь готовили методом прямого суспендирования из нескольких однотипных изолированных колоний стафилококков в стерильном физиологическом растворе и доводят до мутности 0,5 по МакФарланду ($1,5 \times 10^8$ 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°C в течение полных 24 часов. Появление видимого роста после инкубации на месте нанесения культуры считали проявлением устойчивости данного штамма к оксациллину (метициллину). Исследование проводили при обязательном контроле роста испытуемых культур на агаре Мюллера-Хинтон с 4% NaCl без оксациллина (культуры наносили также как на агар с оксациллином). Параллельно с исследуемыми культурами тестировали также контрольные штаммы метициллинчувствительных и метициллинрезистентных стафилококков.

Моноциты периферической крови получали стандартным методом адгезии к плоским поверхностям из моноклеарных клеток, выделенных из гепаринизированной венозной крови центрифугированием в градиенте плотности фиколл-урографина ($\rho=1,077$) [8]. Функции фагоцитоза оценивали с помощью MRSA и MSSA меченых FITC. Анализ окрашенных клеток проводили на проточном цитофлюориметре FC-500 (Beckman Coulter, USA) [8, 9, 10] с использованием прямой иммунофлюоресценции цельной периферической крови с использованием моноклональных антител (Beckman Coulter, USA), меченных FITC (fluorescein

isothiocyanate), PE или RD1 (phycoerythrin), PC5 (phycoerythrin-cyanin 5) и PC7 (phycoerythrin-cyanin 7) в следующей панели: FITC/CD14-PE/CD45-PC7/CD16-PC5 [11].

Исследование интенсивности «респираторного взрыва» моноцитов осуществляли через определение активности люцигенин- и люминол-зависимой спонтанной и индуцированной хемилюминесценции. Индукцию моноцитов осуществляли живой бактериальной культурой MRSA/MSSA в концентрации 10^6 КОЕ/мл.

Описание выборки производили с помощью подсчета медианы (Me) и интерквартильного размаха в виде 1 и 3 квартилей (Q_{25} и Q_{75}). Достоверность различий между показателями зависимых выборок оценивали по непараметрическому критерию Вилкоксона. Статистический анализ осуществляли в пакете программ Statistica 6.1 (StatSoft Inc., 2007).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Определение функциональной активности моноцитов у больных полипозным риносинуситом включало в себя оценку кислородзависимой системы фагоцитоза в виде определения хемилюминесцентной активности клеток и кислороднезависимого фагоцитоза.

Хемилюминесцентное определение функциональной активности моноцитов базировалось на определении базовой активности моноцитов и резервных возможностей клеток при воздействии на них специфического индуктора в виде живой бактериальной суспензии MRSA относительно MSSA. Отдельно исследована способность моноцитов к образованию супероксидного аниона ($-\text{O}_2^-$) при активации люцигенином и образование общего пула свободных радикалов кислорода при активации люминолом [12]. Супероксидный анион-радикал образуется в результате ферментативных реакций и относиться к первичным радикалам кислорода являясь источником для вторичных радикалов (H_2O_2 , $\cdot\text{OH}$, $^1\text{O}_2$, HClO) выделяемых фагоцитами.

При исследовании люминол- и люцигенин-зависимой активности моноцитов в ответ на индукцию MRSA, было выявлено снижение интенсивности хемилюминесцентной реакции относительно спонтанной активности клеток в 3 раза, и повышение активности моноцитов относительно MSSA в 1,5 раза.

В результате исследования кислороднезависимого фагоцитоза моноцитов в ответ на воздействие MRSA относительно MSSA было обнаружено снижение фагоцитарного числа общей популяции моноцитов в 2 раза. Оценка активности субпопуляционного состава моноцитов при воздействии штаммов MRSA относительно MSSA показала снижение фагоцитарного индекса субпопуляций CD14^{low}CD16⁺-моноцитов и фагоцитарного числа CD14⁺CD16⁺-клеток в 2 раза, а также фагоцитарного числа субпопуляций CD14⁺CD16⁻-моноцитов в 2 раза.

Таким образом при воздействии MRSA значительно изменяется хемилюминесцентная активность моноцитов периферической крови у больных полипозным риносинуситом. Обнаружено, что при индукции «респираторного взрыва» с помощью MRSA относительно MSSA активность НАДФН-оксидазы снижается. Цитотоксическая активность моноцитов определяется уровнем продукции как первичных, так и вторичных активных форм (гидроксильный радикал, перекись водорода и др.) кислорода. В люминол-зависимом процессе снижение интенсивности моноцитов крови при воздействии MRSA определяет пониженный уровень «респираторного взрыва», что в целом характеризует недостаточность цитотоксической активности моноцитов в ответ на воздействие золотистого стафилококка устойчивого к метициллину.

Исследование показало, что у больных полипозным риносинуситом в ответ на воздействие MRSA происходит снижение фагоцитарной активности относительно MSSA, при этом обнаружено, что фагоцитарное число значительно ниже, как в классических моноцитах с фенотипом CD14⁺CD16⁻, так и в провоспалительных CD14⁺CD16⁺-клетках. Можно отметить, что у больных полипозным риносинуситом при индукции MRSA установлены изменения в фенотипическом составе и интенсивности «респираторного взрыва» моноцитов периферической крови. Интенсивность «респираторного взрыва» в общей фракции моноцитов крови при индукции MRSA снижена. Можно предположить, что при индукции золотистым стафилококком функциональная активность моноцитов подавлена.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ № 16-44-240668 и Краевого государ-

ственного автономного учреждения «Красноярский краевой фонд поддержки научной и научно-технической деятельности».

ЛИТЕРАТУРА

1. Игнатова И.А., Коленчукова О.А., Смирнова С.В., Манчук В.Т., Капустина Т.А., Ким Т.И., Чижмотря Н.М. Микробиоценоз слизистой оболочки носа при аллергической риносинусопатии // *ЖМЭИ*, 2007, № 1, С. 62–64.
2. Kolenchukova, O.A., Smirnova, S.V., Lazareva, A.M. Features of microbiocenosis of nose mucous membrane during atopic and polypous rhinosinusitis // *Zh. mikrobiol. (moscow)*, 2017, no. 1, p. 67–73.
3. Flack C.E., Zurek O.W., Meishery D.D., Pallister K.B., Malone C.L., Horswill A.R., Voyich J.M. Differential regulation of staphylococcal virulence by the sensor kinase SaeS in response to neutrophil-derived stimuli // *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2014, vol.111, no 13, pp.19-25.
4. Shahkarami F., Rashki A., Rashki Ghalehnoo Z., Jundishapur J. Susceptibility and Plasmid Profiles of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* and Methicillin-Susceptible *S. aureus* // *Microbiol.* 2014, Vol.7, no. 7, pp.37-42.
5. Lauvau G., Chorro L., Spaulding E., Soudja S.M. Inflammatory monocyte effector mechanisms. *Cell Immunol* // 2014, Vol. 291, no. 1-2, pp. 32-40.
6. Shi C., Pamer E.G. Monocyte recruitment during infection and inflammation//*Nat. Rev. Immunol.* 2011, Vol. 11, no. 11, pp. 762-774.
7. Maecker H., McCoy P., Nussenblatt R. Standardizing immunophenotyping for the human immunologyproject //*Nat. Rev. Immunol.*, 2012, Vol. 12, pp. 191-200.
8. Hristov M., Schmitz S., Nauwelaers F., Weber C. A flow cytometric protocol for enumeration of endothelialprogenitor cells and monocyte subsets in human blood //*J. Immunol. Methods*, 2012, Vol. 381, no. 1-2, pp. 9-13.
9. Appleby L.J., Nausch N., Midzi N., Mduluzi T., Allen J.E., Mutapi F. Sources of heterogeneity in human-monocyte subsets //*Immunol. Lett.*, 2013, Vol. 152, no. 1, pp. 32-41.
10. Gordon S. Targeting a monocyte subset to reduce inflammation //*Circ. Res.*, 2012, Vol. 110, no. 12, pp. 1546-1548.
11. Luidier J.I., Cyfra M., Johnson P., Auer I. Impact of the new Beckman Coulter Cytomics FC 500 5-color flowcytometer on a regional flow cytometry clinical laboratory service // *Lab. Hematol.*, 2004, Vol. 10, pp. 102-108.
12. Nocca G., De Sole P., Gambarini G., De Palma F., Parziale V., Giardina B., Lupi A. Alteration of monocyticcell oxidative burst caused by methacrylic monomers present in dental materials: a chemiluminescence study // *Luminescence*, 2006, Vol. 21, no. 3, pp. 202-206.