

УДК 577.15:576.08;57.085.23:57.047

©Коллектив авторов

## МЕТАБОЛИЗМ КЛЕТОК ВРОЖДЕННОГО ИММУНИТЕТА ПРИ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ИНФЕКЦИЯХ

*Н.Г. Плехова<sup>1,2\*</sup>, Л.М. Сомова<sup>1</sup>, Е.И. Дробот<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>Научно исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии  
Сибирского отделения Российской академии медицинских наук,  
690087, Владивосток, ул. Сельская 1; тел./факс: +742321438;  
эл. почта: pl\_nat@hotmail.com

<sup>2</sup>Дальневосточный Федеральный университет, Школа биомедицины, Владивосток

Приведён анализ метаболической активности клеток врожденного иммунитета, зараженных грамотрицательными (*Yersinia pseudotuberculosis*, *Salmonella enteritidis*) и грамположительными (*Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*) бактериями при различной дозе инфицирования. На различных модельных животных установлено, что в начальные сроки (до 2-х сут) смена клеточных реакций зависит от вида возбудителя, которыми они инфицированы. В ответ на заражение грамотрицательными бактериями в месте воспаления отмечалось преимущественное накопление нейтрофилов, а при введении грамположительных – макрофагов. Исследование метаболизма этих клеток показало, что на появление патогена реакция праймированных фагоцитов, которые находятся в последней стадии дифференцировки, выше, чем у клеток системного кровотока. Определено, что помимо состояния праймированности, на реактивность фагоцитов оказывает влияние бактериальная нагрузка. Так, при низком соотношении фагоцит/микроб реакция клетки почти отсутствует, тогда как при избытке микроорганизмов, несмотря на возрастание фагоцитарных показателей, происходит гиперактивация метаболизма клеток и продуцируется предельное количество бактерицидных агентов, которые оказывают разрушающее воздействие на саму клетку.

**Ключевые слова:** клетки врождённого иммунитета, ферменты, оксид азота, бактериальные инфекции.

### ВВЕДЕНИЕ

Модельные опыты, будучи нацеленными на воспроизведение инфекций человека у животных, преследуют несколько задач: воссоздать клинико-анатомический комплекс симптомов, характеризующих определённое заболевание, этиологически обосновать эту болезнь, раскрыть её патогенез и возможности лечения. Клетки врожденного иммунитета – нейтрофилы и моноциты/макрофаги – играют значительную роль в поддержании низкого уровня инфицированности организма и принимают участие в развитии адаптивного иммунитета [1, 2]. Несмотря на то, что достаточно хорошо обоснованы представления о гуморально-клеточных взаимоотношениях в процессе иммунного ответа, тем не менее, каждая из клеточных популяций в конкретных ситуациях способна

реагировать достаточно автономно, а в некоторых случаях и избирательно [3, 4]. Прямое отношение к развитию различных клинико-морфологических форм бактериальных заболеваний имеет скорость смены одной клеточной популяции на другую. В зависимости от того какая клетка, нейтрофил или макрофаг, будет являться ключевой в определенный временной промежуток, в дальнейшем проявляется направление иммунного ответа организма [5]. Поэтому при воспроизведении инфекционно-воспалительных процессов в эксперименте необходимо учитывать как индивидуальную восприимчивость модельного организма для возбудителя, так и биологические свойства самого инфекционного агента.

На настоящий момент в проблеме резистентности организма к бактериальным инфекциям остаётся недостаточно изученным

\* - адресат для переписки

ряд вопросов, касающихся значимости ферментных систем клеток врождённого иммунитета и образования в них оксида азота. Также, важное значение, имеет исследование бактерицидных свойств клеток с учётом антигенной нагрузки (количество бактерий на один фагоцит) и биологических свойств используемых в эксперименте бактериальных агентов.

Известно, что завершённость фагоцитоза возможна только в ограниченном интервале доз повреждающих нагрузок, так как слишком малые или сильные воздействия на клетку вызывают инактивацию программы антибактериальной защиты [6, 7]. Поэтому при низком соотношении микроб/фагоцит реакция клеток почти отсутствует, тогда как при избытке бактерий, когда фагоцит поглощает максимальное их количество, происходит гиперактивация его ферментных систем. В результате чего разрушаются не только микробы, но и сама клетка, и факторы бактерицидности попадают во внеклеточное пространство. Для нейтрофилов и макрофагов кислородное дыхание не является системой жизнеобеспечения, так как они почти не содержат митохондрий и способны выполнять ряд функций в условиях анаэробноза [8]. Характерной особенностью их метаболизма является способность под влиянием стимулов генерировать в большом количестве кислородные радикалы. На первом этапе “респираторного” взрыва для образования из молекулы кислорода супероксидного аниона  $O_2^{\cdot -}$ , донором электронов является NADH-оксидазный комплекс. Помимо пути, когда акцептором для образования реактивных продуктов является кислород, в клетках также может идти образование этих продуктов путём переноса водорода от субстрата – его “донора” – на “акцептор”. Эта реакция осуществляется с помощью ферментов, активность которых реализуется в зависимости от того, в преобразовании каких субстратов они принимают участие. В последующих реакциях окисления участвует цитохромоксидаза дыхательной цепи [9]. Помимо кислородзависимых и кислороднезависимых бактерицидных механизмов в фагоцитах существуют нитроксидзависимые механизмы антиинфекционной защиты. Цитостатическое/цитотоксическое действие оксида азота (NO) обусловлено его способностью вступать в реакцию с супероксидным радикалом с образованием пероксинитрита ( $ONOO^-$ ), в результате чего может индуцироваться апоптоз и мутации генов различных клеток [10, 11].

Исходя из вышеизложенного, целью настоящего исследования явилось изучение

метаболизма клеток врожденного иммунитета различных животных (морские свинки, крысы и мыши), заражённых грамотрицательными (*Yersinia pseudotuberculosis*, *Salmonella typhimurium*) и грамположительными (*Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*) бактериями, с учётом антигенной нагрузки на клетку.

## МЕТОДИКА

### *Инфекционные агенты и экспериментальные животные*

Для экспериментов использованы 250 белых беспородных половозрелых мышей-самцов массой 18-25 г 70 морских свинок массой 150-200 г, 50 крыс массой 150-200 г. Животные были получены из питомника РАМН “Столбовая” и находились на стандартной диете в боксированных помещениях с соблюдением всех правил и международных рекомендаций Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых в экспериментальных работах.

В качестве инфекционных агентов и объектов фагоцитоза использовали грамотрицательные (*Yersinia pseudotuberculosis*, *Salmonella enteritidis*) и грамположительные (*Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*) бактерии. Бактерии вводили животным внутривентриально, в одинаковой дозе, исходя из массы модельных животных – 500 тыс. м.т. на крысу и морскую свинку (200-300 г), 50 тыс. м.т. на мышшь (20-30 г), срок наблюдения составил 48 ч. Для асептического воспаления использовали стерильное вазелиновое масло.

Первичную культуру макрофагов получали по методу Grabenstein с соавт. [18]. Концентрацию клеток доводили до  $1 \times 10^6$  кл/мл в среде 199 (ФГБУ “Институт полиомиелита и вирусных энцефалитов им. М.П. Чумакова” РАМН, Москва) с 5% эмбриональной сывороткой (НПО “Вектор”, пос. Кольцово), инкубировали с целью полного созревания культуры в течение трех суток, после чего использовали для экспериментов. Для культивирования клеток использовали среду 199, которая содержала эмбриональную сыворотку коровы (5%), 0,2 мкМ гентамицин и пенициллин (100 ед/мл).

Первичную культуру нейтрофилов мышшь получали, вызывая внутривентриальное воспаление путём введения стерильного 10% мясопептонного бульона (0,5 мл). Через 9 ч перитонеальную полость мышшь промывали 5 мл холодной среды 199 и концентрацию клеток доводили до  $2 \times 10^6$  кл/мл. Для культивирования нейтрофилов использовали среду 199, включавшую 20% эмбриональной

сыворотки коровы, 2 мкМ глутамин, 0,2 мкМ гентамицин и 100 ед/мл пенициллин.

Фракцию адгезирующих клеток крови получали из 5,0 мл гепаринизированной (10 ед/мл) венозной крови после инкубирования с 0,5 мл 1% раствора желатина. Надосадочную жидкость собирали и центрифугировали при 750 g в течение 12 мин, трижды отмывали от гепарина при тех же условиях и концентрацию клеток доводили до  $2 \times 10^6$  кл/мл.

#### Методы оценки функциональной активности фагоцитов

**Определение содержания метаболитов оксида азота (NO) – нитритов ( $\text{NO}_2^-$ ).** После инкубации при 37°C заражённых бактериями клеток надосадок и монослой клеток замораживали и хранили при -20°C. К разрушенным клеткам добавляли по 100 мкл Griess реактива, который состоял из равных объёмов 0,1% N-(1-нафтил)этилендиамин дигидрохлорида и 1% *n*-аминобензол-сульфаниламида (“ICN”, США), на основе 2,5% раствора фосфорной кислоты [12]. После 10 мин контакта определяли оптическую плотность полученных субстратов на спектрофотометре “Multiscan Titertek Plus” (“Flow lab.”, Финляндия) при 540 нм.

**НСТ тест.** К адгезированным клеткам добавляли по 100 мкл раствора Хенкса без фенолового красного, содержащего бактерии и нитросиний тетразолий (НСТ, 1 мг/мл, ICN) [13]. Контроль составили интактные фагоциты. После инкубации образовавшийся в клетках диформаза растворяли предварительно разогретым до 83°C диметилсульфоксидом. Оптическую плотность измеряли на спектрофотометре при длине волны 540 нм.

**МТТ тест.** К фиксированному монослою клеток добавляли 100 мкл субстрата для сукцинатдегидрогеназы – метилтиазолилтетразолий бромид (МТТ, 3-[4,5-диметилтиазолил-2]-2,5-дифенил тетразолия бромида, “ICN”) 2 мг/мл на основе фосфатного буфера pH 7,2 с 0,4%  $\text{MnCl}_2$ . Монослой клеток с субстратами инкубировали при 37°C в течение 30 мин. Гранулы диформаза растворяли добавлением 100 мкл изопропилового спирта, подкисленного 0,04 М HCl. Оптическую плотность субстратов определяли на спектрофотометре при длине волны 540 нм.

**Определение активности миелопероксидазы (МПО).** В лунки планшетов, к фиксированным клеткам вносили по 100 мкл ОФД (*o*-фенилендиамин, “ICN”), (4 мг на 10 мл) на основе фосфатно-цитратного буфера (pH 5,0)

с добавлением 500 мкл 0,33 % перекиси водорода [13]. Реакцию останавливали добавлением 10% раствора серной кислоты по 100 мкл на лунку. Оптическую плотность субстратов определяли на спектрофотометре при длине волны 492 нм.

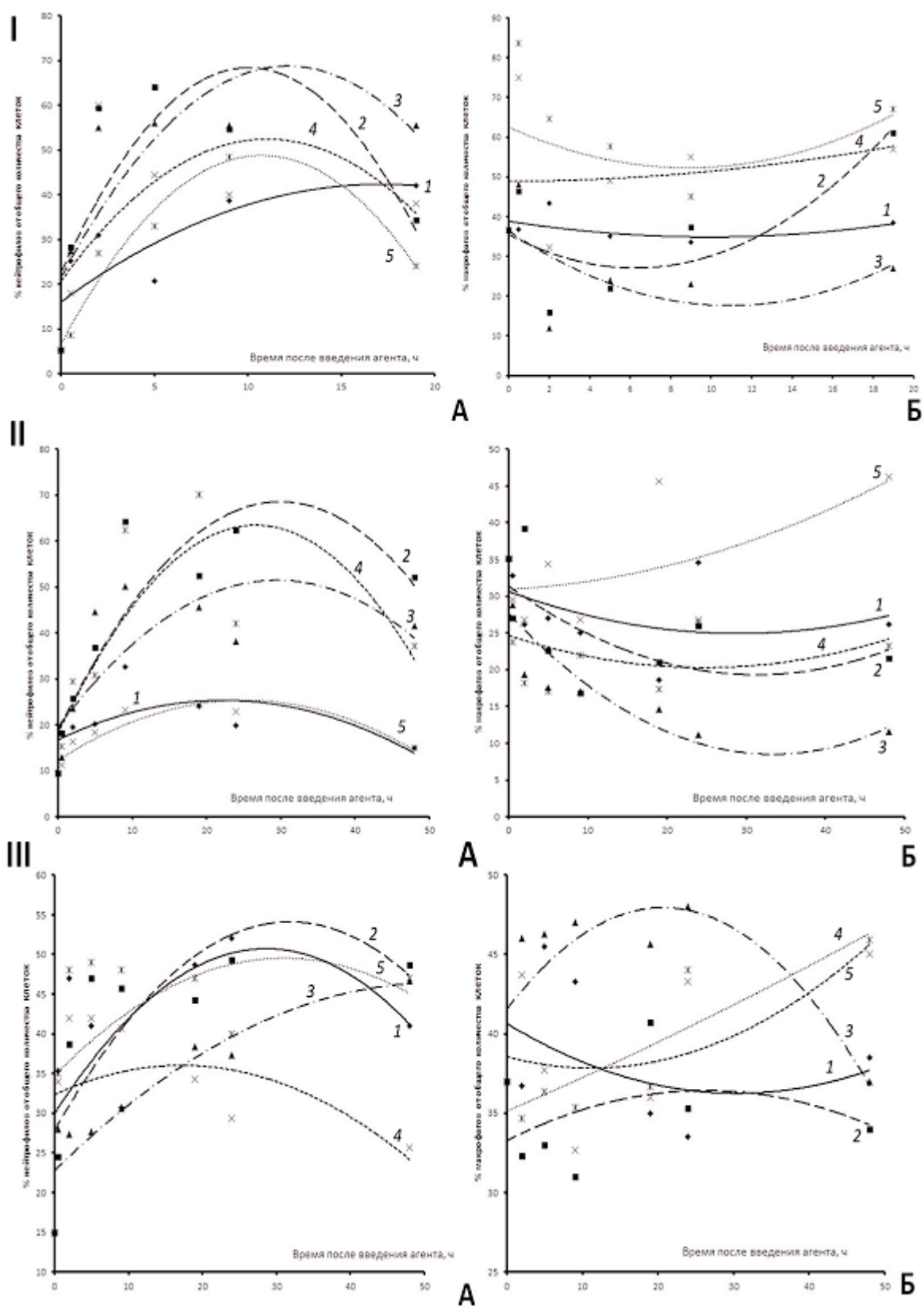
**Активность катионных белков.** В планшеты с фиксированным монослоем нейтрофилов вносили по 100 мкл раствора прочного зелёного (“Fast Green”, “Serva”, Германия) (1 мг/1 мл) на основе метанолового трис-HCl-буфера (pH 8,0-8,2). Связанный с катионными белками краситель растворяли диметилсульфамидом (DMSO, ICN), по 50 мкл на лунку. Оптическую плотность субстратов определяли на спектрофотометре при длине 620 нм.

**Результаты спектрофотометрического исследования** выражали в виде индекса стимуляции (Т), который вычислялся как отношение разности между средними показателями оптической плотности растворов, содержащих продукты реакции опытных и интактных клеток к среднему показателю оптической плотности раствора для интактных клеток, в процентах.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

При одинаковых условиях заражения грамотрицательными (*Y. pseudotuberculosis*, *S. enteritidis*) и грамположительными (*St. aureus*, *L. monocytogenes*) бактериями различных модельных животных (мыши, крысы и морские свинки) нами была исследована реакция нейтрофилов и макрофагов. Для асептического воспаления использовали стерильное вазелиновое масло, в качестве контроля применяли показатели интактных животных. Полученные результаты были обработаны с помощью регрессионного анализа методом наименьших квадратов, который позволил выявить общие тенденции количественных и качественных показателей реакции клеток на появление бактерий. Данные представлены на рисунках, где точками обозначены цифровые показатели, а тенденции – линиями (трендами). Для аппроксимации данных использовали полиномиальную линию тренда, которая применяется для описания величин, попеременно возрастающих и убывающих.

Установлено, что в очаге воспаления последовательность клеточных реакций на введение указанных агентов была различной. При заражении животных вирулентным штаммом *Y. pseudotuberculosis* в начальные сроки после заражения (5 ч) отмечалось преимущественное накопление нейтрофилов, коэффициент угла подъёма тренда составил от 0,453 (рис. 1, Ia).



**Рисунок 1.** Количество нейтрофилов (А) и макрофагов (Б) в очаге воспаления морских свинок (I), мышей (II) и крыс (III) при асептическом воспалении (■ 1) и заражении *Y. pseudotuberculosis* (◆ 2), *S. enteritidis* (▲ 3), *St. aureus* (X 4) и *L. monocytogenes* (Ж 5).



Подобная, но более интенсивная реакция этих клеток в очаге воспаления наблюдалась у группы животных, заражённых *S. enteritidis*. С самого начала инфекции процент нейтрофилов достоверно ( $p < 0,01$ ) был выше, чем у интактных животных. Накопление макрофагов в очаге воспаления животных, зараженных указанными бактериями, отмечалось в поздние сроки инфекции (рис. 1, Iб). Углы наклона трендов составили 0,217 и 0,158 соответственно.

У животных, заражённых грамположительными бактериями, наблюдалась замедленная реакция нейтрофилов, и их количество возрастало только к концу срока наблюдения, а число макрофагов, напротив, нарастало. Причём при заражении морских свинок *L. monocytogenes* процент содержания макрофагов в очаге воспаления достоверно превышал таковой у животных, инфицированных *St. aureus*, на протяжении всего наблюдаемого периода (рис. 1, Ia). При асептическом воспалении, начиная с первых часов наблюдения, также наблюдалось достоверное повышение количества макрофагов (рис. 1, Iб).

Подобная реакция клеток в ответ на введение грамотрицательных бактерий, *St. aureus* и стерильного вазелинового масла была обнаружена в очаге воспаления других модельных животных – мышей и крыс (рис. 1, II, III). При заражении животных *L. monocytogenes* (рис. 1, II), обнаружена иная реакция фагоцитов. Эти данные можно объяснить известным фактом, что грызуны являются природными носителями возбудителя листериоза и эта бактерия, в отличие от остальных, не вызывает у них заболевания [14]. Таким образом, являясь условно патогенным инфектом для мышей и крыс, этот микроорганизм вызывает отличающуюся от морских свинок ответную реакцию клеток врождённого иммунитета.

У интактных животных в крови содержание моноцитов небольшое по сравнению с количеством нейтрофилов. Процент от общего количества ядросодержащих клеток для нейтрофилов составил  $22,5 \pm 2,3$  и для моноцитов  $4,09 \pm 0,5$  ( $p < 0,05$ ). Изменение показателей нейтрофилов в группе животных, зараженных грамотрицательными бактериями, наиболее ярко отражало наличие инфекционного процесса в организме. В крови у этих животных отмечалось снижение количества указанных клеток, что указывало на отток фагоцитов к месту воспаления. Минимальные показатели через 7 ч после заражения *Y. pseudotuberculosis* и *S. enteritidis* составили  $8,7 \pm 0,9$  и  $13,4 \pm 1,2\%$  соответственно ( $p > 0,05$ ). В группе животных,

заражённых грамположительными бактериями, количество гранулоцитов, превышало контрольные показатели в первые часы после заражения и продолжало возрастать к концу срока наблюдения. Так, максимальные показатели отмечались при заражении *St. aureus* уже через 30 мин, а при введении *L. monocytogenes* через 5 ч и составили  $53,7 \pm 5,4$  и  $49 \pm 3,7\%$  соответственно ( $p > 0,05$ ).

Процентное содержание моноцитов в периферической крови животных, инфицированных бактериями, статистически достоверно отличалось от контрольных показателей на протяжении всего наблюдаемого срока ( $p < 0,01$ ). Причем наиболее высокие показатели до  $13,7 \pm 1,4$  отмечались через 7 ч после заражения животных *L. monocytogenes*, тогда как при инфицировании *St. aureus*, количество моноцитов уменьшалось к концу срока наблюдения ( $2,7 \pm 0,7\%$ ). Изменение содержания этих клеток в крови животных, которым вводили стерильное вазелиновое масло, было недостоверным по сравнению с интактными.

Таким образом, на различных модельных животных установлено, что в начальные сроки (до 2-х сут) смена клеточных реакций в организме зависела от вида возбудителя, которым он инфицирован. В ответ на заражение грамотрицательными бактериями в месте воспаления отмечалось преимущественное содержание нейтрофилов, тогда как при введении грамположительных – макрофагов. В крови наличие инфекционного процесса при заражении животных *L. monocytogenes* и *St. aureus* сопровождалось повышением количества моноцитов и нейтрофилов, тогда как при инфицировании *Y. pseudotuberculosis* содержание этих клеток было сниженным.

С целью изучения реакции нейтрофилов и макрофагов в зависимости от вносимой дозы *Y. pseudotuberculosis* и *St. aureus* был исследован метаболизм этих клеток. На один фагоцит вносили бактерии в следующих соотношениях 1:5, 1:10, 1:25 и 1:50. Состояние кислородзависимого метаболизма клеток оценивали по суммарной активности ферментов дыхательной цепи в НСТ-тесте, внутриклеточному содержанию сукцинат-дегидрогеназы (СДГ) и миелопероксидазы (МПО). Также определяли количество метаболитов оксида азота и неферментных катионных белков. Данные выражали в виде индекса стимуляции – Т, %, показатели интактных клеток были приняты за 0.

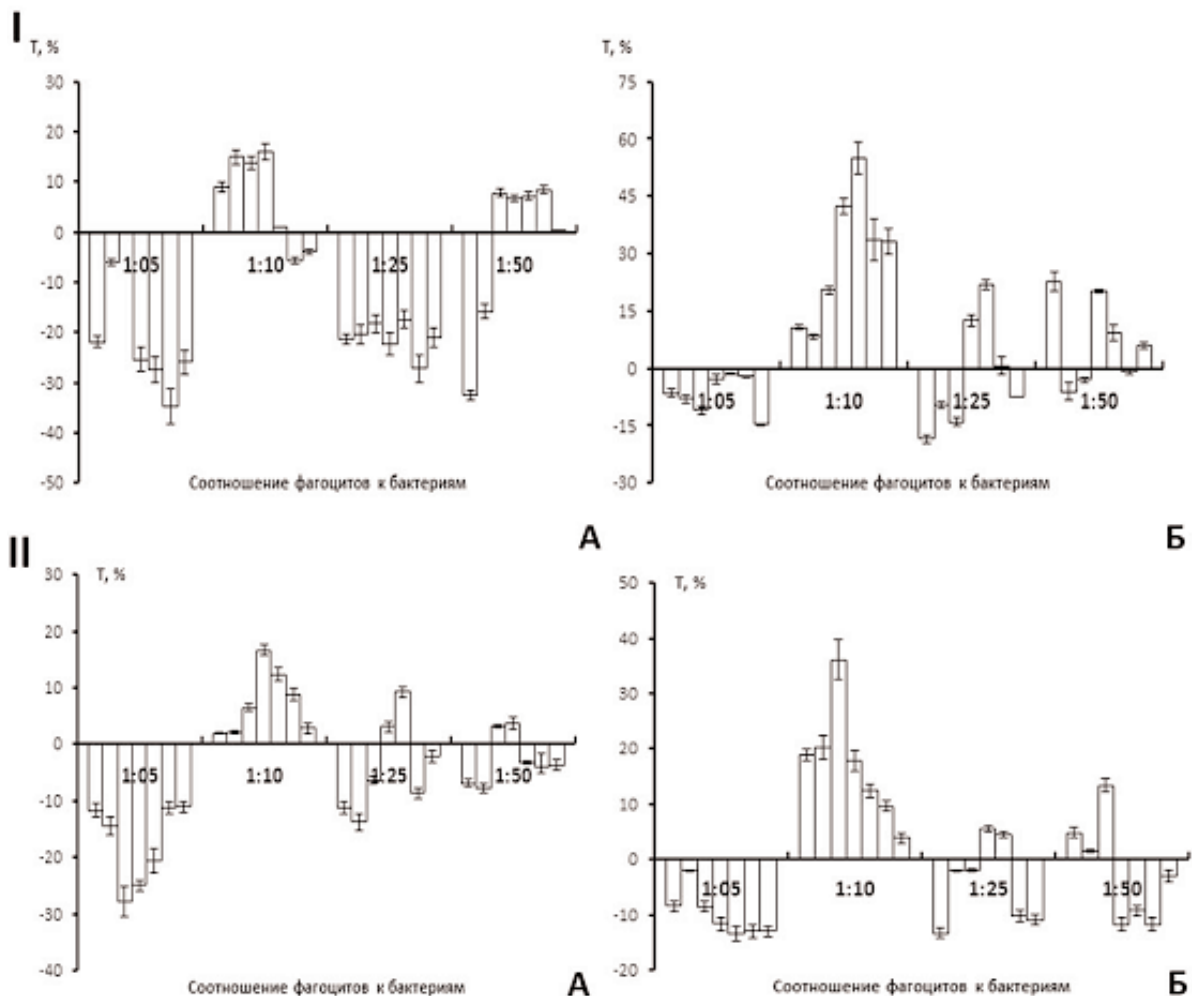
Достоверное повышение активности ферментов дыхательной цепи в НСТ-тесте

было обнаружено при микробной нагрузке 1:10. Причём, значения индекса стимуляции для этих клеток были достоверно выше уровня контроля на протяжении всего наблюдаемого периода (рис. 2). При всех остальных соотношениях бактерий к фагоцитам эти показатели были сниженными, как в клетках крови, так перитонеального экссудата. При этом необходимо отметить, что если в фагоцитах крови максимальные показатели НСТ-теста отмечались через 2 ч после заражения *St. aureus*, *Y. pseudotuberculosis* и составили  $16,08 \pm 1,7$  и  $16,07 \pm 1,2\%$  соответственно (рис. 2, Ia,IIa), то в клетках перитонеального экссудата эти показатели были значительно выше (рис. 2, Ib,IIб).

В фагоцитах, инфицированных бактериями, выявлено значительное повышение активности митохондриальных дегидрогеназ в МТТ-тесте. Максимальные значения индекса стимуляции в клетках крови при заражении *Y. pseudotuberculosis*

наблюдались при микробной нагрузке 1:10 и составили  $74,7 \pm 1,5\%$  (0,5 ч) и  $58,5 \pm 1,5$  (2 ч), а в клетках перитонеального экссудата –  $18,4 \pm 1,6\%$  (0,5 ч) и  $33 \pm 1,4\%$  (2 ч). При контакте клеток с *St. aureus* с указанной нагрузкой индекс стимуляции для фагоцитов крови составил  $28,7 \pm 1,9\%$  (0,5 ч) и  $31,6 \pm 1,6\%$  (2 ч), для клеток перитонеального экссудата  $38,6 \pm 3,7\%$  (0,5 ч) и  $49,8 \pm 2,6\%$  (3 ч). С повышением количества бактерий на один фагоцит активность дегидрогеназ в МТТ-тесте понижалась, а концу срока наблюдения достигала отрицательных значений, что указывало на цитотоксическое действие бактерий.

Активация МПО, субстратом для которой является пероксид водорода, отражает защитную реакцию фагоцитов, преимущественно нейтрофилов, в ответ на внедрение бактерий. Определено, что активность фермента в фагоцитах крови при всех используемых бактериальных нагрузках значительно



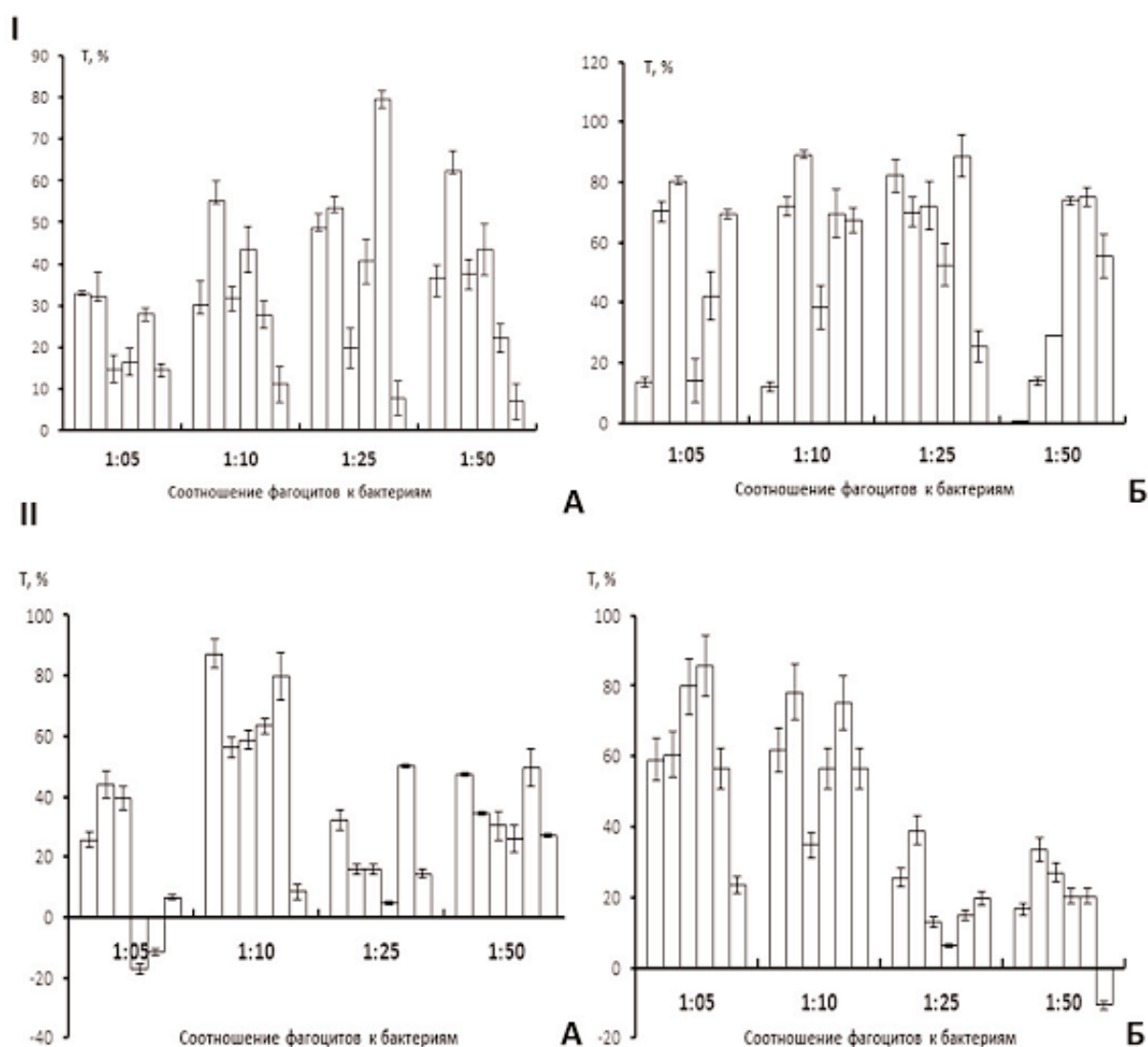
**Рисунок 2.** Активность ферментов дыхательной цепи, показатели НСТ-теста фагоцитов крови (I) и перитонеального экссудата (II), заражённых *St. aureus* (A) и *Y. pseudotuberculosis* (Б) через 45 мин, 1, 1,5, 2, 3, 4 и 5 ч после заражения.

повышалась в период от 1 ч до 3 ч после заражения. При заражении *Y. pseudotuberculosis* в соотношении 1:10 показатели активности фермента клеток соответственно составили  $29,9 \pm 1,4\%$ ,  $55,3 \pm 4,6\%$  и  $43,4 \pm 3,4\%$  (рис. 3, Па). В случае ответа на инфицирование *St. aureus* активность МПО фагоцитов была значительно выше при микробной нагрузке 1:10 и 1:50 (рис. 3, Ia).

По сравнению с клетками крови в фагоцитах перитонеального экссудата активность МПО была высокой на протяжении всего наблюдаемого периода при всех используемых дозах. Наибольшая активность МПО отмечалась при инфицировании *St. aureus* в соотношениях 1:10 и 1:25, что указывало на защитную реакцию клеток при данных дозах заражения (рис. 3, Ib). Суммарные показатели активности

этого фермента в фагоцитах, заражённых *Y. pseudotuberculosis*, в соотношении 1:5 и 1:50 были достоверно на более низком уровне, чем при бактериальной нагрузке 1:10 и ниже чем значения для клеток, инфицированных *St. aureus* (рис. 3, Пб).

В отличие от активности исследованных ферментов кислородзависимого метаболизма в фагоцитах, заражённых бактериями, динамика наработки метаболитов NO была иной. Наблюдалось постепенное повышение содержания метаболитов NO через 1,5 ч после заражения клеток до конца срока наблюдения, как в клетках крови, так и перитонеального экссудата. Причём, уровень метаболитов NO значительно нарастал к концу срока наблюдения (5 ч, рис. 4, I). Максимального значения индекс стимуляции достигал при микробной



**Рисунок 3.** Активность миелопероксидазы в клетках крови (I) и нейтрофилах перитонеального экссудата (II), заражённых *St. aureus* (A) и *Y. pseudotuberculosis* (Б) через 1, 1.5, 2, 3, 4 и 5 ч после заражения.

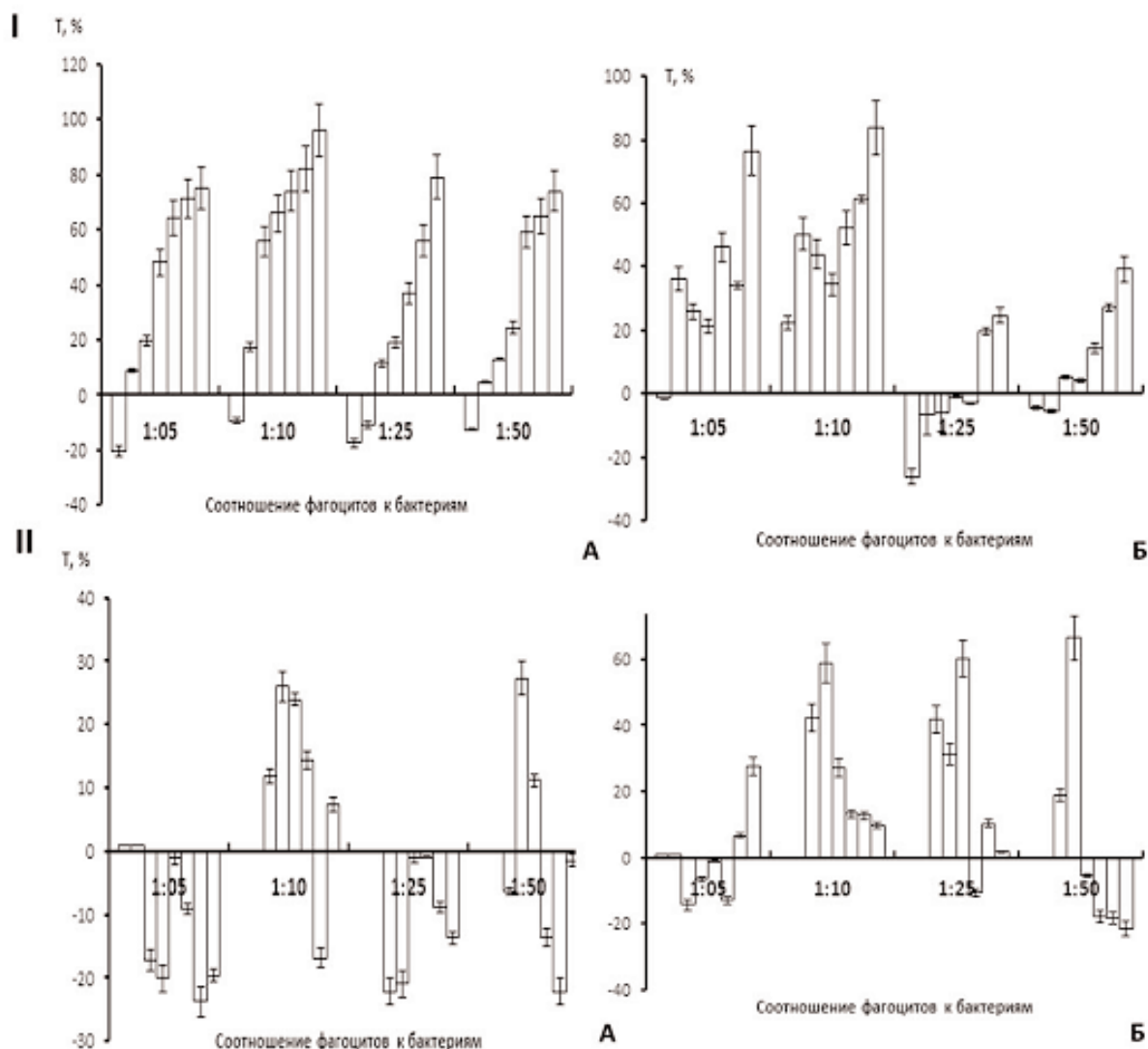
нагрузке 1:10 для клеток крови, зараженных *St. aureus* –  $96 \pm 7,2\%$  и *Y. pseudotuberculosis* –  $83,8 \pm 6,7\%$ . Более выраженная активация нитроксидобразующей системы клеток врожденного иммунитета отмечалась при их контакте с *St. aureus* (рис. 4, Ia). Подобная закономерность была обнаружена нами при определении количества нитритов в фагоцитах экссудата, зараженных указанными бактериями.

Особый интерес при исследовании белков цитоплазматических гранул нейтрофилов вызывают неферментные бактерицидные белки с низкой молекулярной массой, которые обладают бактерицидным действием [15]. После контакта фагоцитов крови с бактериями определено увеличение внутриклеточного содержания катионных белков при соотношениях клеток к бактериям 1:10 после заражения *S. aureus* и при инфицировании *Y. pseudotuberculosis* с микробной нагрузкой 1:10 и 1:25 (рис. 4, IIa,б).

Максимального значения показатели активности КБ в фагоцитах достигали через 2 ч контакта. В конце срока наблюдения обнаруживалось снижение внутриклеточного содержания катионных белков ниже уровня интактных клеток, что можно объяснить выделением фагоцитами этих веществ во внеклеточное пространство.

## ОБСУЖДЕНИЕ

Традиционно считается, что вне зависимости от биологических свойств бактерий в начальные сроки заболевания в очаге воспаления из клеток врожденного иммунитета преобладают нейтрофилы. Тем не менее, исследователями отмечается, что периодичность эмиграции клеток врожденного иммунитета при бактериальных инфекциях недостаточно изучена [16]. Актуальность этого вопроса обусловлена тем, что в последние годы было доказано



**Рисунок 4.** Содержание нитритов (I) и катионных белков (II) в клетках крови, зараженных *St. aureus* (A) и *Y. pseudotuberculosis* (Б) через 1, 1.5, 2, 3, 4, 5 и 6 ч после заражения.



существование в крови человека трёх популяций моноцитов, которые отличаются степенью выраженности на их поверхности паттернраспознающих рецепторов CD14 и CD16 [17]. Причем, функциональные свойства, включая секрецию цитокинов и бактерицидных факторов, а также скорость миграции провоспалительной субпопуляции моноцитов к очагу воспаления подобна нейтрофилам [18].

Нами в экспериментах на различных модельных животных установлено, что в период до 2-х сут. смена клеточных реакций в организме зависела от вида возбудителя, которым он инфицирован. Так, при заражении животных грамположительными бактериями обнаружено, что в начале инфекции в очаге воспаления преобладали макрофаги, а в последующем (свыше 9 часов после заражения) – нейтрофилы. Подобная реакция клеток описана и другими исследователями при асептическом воспалении и внутрибрюшинном заражении мышей *L. monocytogenes*. Показано, что “неклассическая” субпопуляция моноцитов, меченная на присутствие специфических для неё рецепторов, появлялась в очаге воспаления уже через 2 ч после заражения, в то время как нейтрофилы только начинали проникать в перитонеальную полость мышей [14, 19]. При инфицировании грамотрицательными бактериями, в эти же сроки выявлено первоначальное накопление нейтрофилов, сменяющееся притоком клеток моноцитарного типа. Необходимо отметить, что в случае заражения *Y. pseudotuberculosis* реакция клеток была несколько ниже, чем при инфицировании *S. enteritidis*. На наш взгляд, это обусловлено биологическими свойствами иерсиний, которые, как известно, способны противостоять фагоцитозу и внутриклеточно размножаться [20].

Таким образом, во время инфекций, после проникновения в организм патогенных микроорганизмов инициируется сложный каскад событий, в котором ключевая роль отводится клеткам врожденного иммунитета [21]. Установленная нами зависимость смены клеточной популяции от вида возбудителя подтверждает избирательность клеточной реакции на патоген и от того, какая клетка – моноцит или нейтрофил – инициирует каскад последующих цитокиноопосредованных реакций, происходит дальнейшее развитие защитной реакции организма.

В отличие от адаптивного иммунитета, врожденное иммунное распознавание реализуется с помощью наследственно закодированных рецепторов. Антимикробный потенциал фагоцитов складывается из суммы взаимодополняющих, нередко

взаимокомпенсирующих реакций, которые обеспечивают максимальную эффективность их бактерицидного потенциала [22]. С точки зрения реактивности, бактерицидные системы клеток врожденного иммунитета можно разделить на две группы факторов. Первые, которые образуются или резко активируются при непосредственной стимуляции фагоцита, например; усиление окислительного метаболизма, и вторые, синтезируемые в процессе гранулопоэза, когда их количество не зависит от стимуляции клетки (лизозим, лактофerrин, гранулярные катионные белки и т.п.). Проведенное нами исследование метаболизма клеток показало, что реакция на появление патогена у праймированных фагоцитов, которые находятся в последней стадии дифференцировки (перитонеальный экссудат, очаг воспаления), была выше, чем у клеток системного кровотока.

Помимо состояния праймированности, на реактивность фагоцитов определённое влияние оказывает бактериальная нагрузка, то есть доза заражения. С позиции ферментативной активности клеток нами показано, наиболее физиологичной является микробная нагрузка 1:10, при которой обнаруживается выраженная активность кислородзависимой бактерицидной системы клеток врожденного иммунитета. Этот вывод подтверждают данные по изучению активности фермента, принимающего участие в ликвидации активных форм кислорода – МПО. Эти данные позволили впервые достоверно обосновать эффективность использования бактериальной нагрузки 1:10. На наш взгляд, именно это соотношение клеток к бактериям целесообразно применять как при изучении гомеостаза организма, так и при различных патологических состояниях.

Таким образом, обобщая результаты полученных нами исследований, можно сказать, что интерпретацию показателей функциональной активности клеток врожденного иммунитета при различных патологиях необходимо проводить, учитывая биологические свойства бактериального агента, степень бактериальной нагрузки на клетку и состояние праймированности фагоцитов, что, в свою очередь, зависит от длительности инфекции.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Тоголян А.А., Фрейдлин И.С. (2000) Клетки иммунной системы, Наука, СПб.
2. Маянский А.Н., Маянский Д.Н. (1989) Очерки о нейтрофиле и макрофаге, Наука, Новосибирск.
3. Silva M.T. (2010) J. Leukoc. Biol., **87**, 93-106.
4. Harrison O.J., Maloy K.J. (2011) J. Innate. Immun., **3**, 585-593.

5. Newton K., Dixit V.M. (2012) Cold Spring Harb. Perspect. Biol., **4**, a006049.
6. Плехова Н.Г., Сомова Л.М. (2011) Бюл. СО РАМН, **31**, 3-10.
7. Mastroeni P. (2002) Curr. Mol. Med., **2**, 393-406.
8. Greenberg S. (2002) Curr. Opin. Immunol., **14**, 136-145.
9. Ward P.P., Mendoza-Meneses M., Park P.W., Conneely O.M. (2008) Am. J. Pathol., **172**, 1019-1029.
10. Реутов В.П. (2002) Биохимия, **67**, 353-376.
11. Kaplan S.S., Lancaster J.R., Basford R.E., Simmons R.L. (1996) Infect. Immun., **64**, 69-76.
12. Schulz K., Kerber S., Kelm M. (1999) J. Nitric Oxide, **3**(3), 225-234.
13. Бутаков А.А. (1991) Разработка комплекса экспресс-методов оценки фагоцитарного звена иммунитета для иммуноэпидемиологических исследований, Дисс. канд. мед. наук, НИИ иммунологии, Москва.
14. Lochner M., Kastenmüller K., Neuenhahn M., Weighardt H., Busch D.H., Reindl W., Förster I. (2008) Infect. Immun., **76**, 3881-3890.
15. Levi O. (2002) Expert. Opin. Investig. Drugs, **11**, 159-167.
16. Nathan C. (2006) Nat. Rev. Immunol., **6**, 173-182.
17. Greenberg S., Grinstein S. (2002) Curr. Opin. Immunol., **14**, 136-145.
18. Serbina N.V., Jia T., Hohl T.M., Pamer E.G. (2008) Annu. Rev. Immunol., **26**, 421-452.
19. Auffray C., Fogg D., Garfa M., Elain G., Join-Lambert O., Kayal S., Sarnacki S., Cumano A., Lauvau G., Geissmann F. (2007) Science, **317**, 666-670.
20. Spinner J.L., Seo K.S., O'Loughlin J.L., Cundiff J.A., Minnich S.A., Bohach G.A., Kobayashi S.D. (2010) PLoS One., **18**, e9279.
21. Medzhitov R., Schneider D.S., Soares M.P. (2012) Science, **335**, 936-941.
22. Silva M.T. (2010) J. Leukoc. Biol., **87**, 93-106.

Поступила: 20. 05. 2013.

## THE METABOLISM OF THE INNATE IMMUNITY CELLS IN BACTERIAL INFECTIONS

*N.G. Plekhova<sup>1,2</sup>, L.M. Somova<sup>2</sup>, E.I. Drobot<sup>2</sup>*

<sup>1</sup>Research Institute of Epidemiology and Microbiology,  
Siberian Branch, Russian Academy of Medical Sciences,

1 Selskaya str., Vladivostok, 690087 Russia; tel./fax: +742321438; e-mail: pl\_nat@hotmail.com

<sup>2</sup>Far Eastern Federal University, Vladivostok, 690950 Russia

Metabolic activity of innate immunity cells infected by various doses of Gram-negative (*Yersinia pseudotuberculosis*, *Salmonella enteritidis*) and Gram-positive (*Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*) bacteria has been investigated. Using various animal models we found that during the initial period (up to 2 days) changes of infection in cellular responses depend on the type of the pathogen. In response to infection caused by Gram-negative bacteria predominant neutrophil accumulation in the foci of inflammation was observed, while Gram-positive bacteria induced preferential accumulation of macrophages. The study of metabolism of these cells showed that the response of terminally differentiated primed phagocytes to pathogen appearance was higher than in cells circulating in blood. In addition to the priming state the phagocyte reactivity is influenced by the bacterial load. At a low phagocyte/microbe ratio the cells reaction is almost undetectable, while an excess of microorganisms causes (despite of the increase of the phagocytic parameters) the hyperactivation of cell metabolism and production of maximal amounts of bactericide agents, which exhibit a damaging effect on the cell itself.

**Key words:** innate immune cells, enzymes, nitric oxide, bacterial infection.