

Механизмы воздействия устойчивых к метициллину штаммов *Staphylococcus aureus* на функциональное состояние нейтрофильных гранулоцитов

О. А. КОЛЕНЧУКОВА¹, Н. И. САРМАТОВА²

¹ НИИ медицинских проблем Севера, Красноярск

² Сибирский федеральный университет, Красноярск

Mechanisms of Influence of Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* on Functional State of Neutrophilic Granulocytes

O. A. KOLENCHUKOVA, N. I. SARMATOVA

Research Institute of Medical Problems of the North, Krasnoyarsk

Siberian Federal University, Krasnoyarsk

Целью исследования является оценка функциональной активности нейтрофильных гранулоцитов при воздействии штаммов MSSA и MRSA. Функциональную активность нейтрофильных гранулоцитов определяли с помощью люминолзависимой хемилюминесценции при стимуляции праймирующей дозой MRSA и MSSA. Исследование показало повышенную функциональную активность нейтрофильных гранулоцитов как в ответ на устойчивые бактериальные культуры золотистого стафилококка, так и на чувствительные штаммы. Следует отметить, что интенсивность кислородзависимого фагоцитоза была выше в ответ на MRSA, чем на MSSA.

Ключевые слова: MRSA, MSSA, нейтрофильные гранулоциты.

The aim of the study was to estimate the functional activity of neutrophilic granulocytes after the contact with MSSA and MRSA. It was determined by luminol-dependent chemoluminescence with stimulation by the priming doses of MRSA and MSSA. The functional activity of neutrophilic granulocytes was shown to increase in response to either the resistant *Staphylococcus aureus* strains or the susceptible ones. It should be indicated that the intensity of the oxygen-dependent phagocytosis in response to MRSA was higher than that to MSSA.

Key words: MRSA, MSSA, neutrophilic granulocytes.

Метициллинорезистентный золотистый стафилококк (MRSA) — это штамм золотистого стафилококка, устойчивый к большой группе антибиотиков, в первую очередь бета-лактамов. Так, MRSA адаптировался к выживанию в присутствии метициллина, диклоксациллина и оксациллина. Наиболее часто именно с ним связаны внутрибольничные (нозокомиальные) инфекции. Клиническое значение метициллинорезистентности является предметом интенсивного изучения. Известно, что уровень летальности при бактериемиях, вызываемых MRSA, достоверно выше, чем при инфекциях, обусловленных чувствительными штаммами *S. aureus*. Особое беспокойство вызывает практически повсеместное повышение частоты выделения MRSA [1, 2].

© О. А. Коленчукова, Н. И. Сарматова, 2014

Адрес для корреспонденции: 660022, Красноярск, ул Партизана Железняка, 3. НИИ МПС

В процессе эволюции стафилококки приобрели способность угнетать фагоцитарную функцию лейкоцитов крови путём блокирования опсонизирующих веществ (комплемента и иммуноглобулина G), а также путём непосредственного токсического действия на фагоциты. Нейтрофилы при нарушении окислительного метаболизма не способны к образованию интермедиатов кислорода, вследствие чего организм становится особенно восприимчивым к золотистому стафилококку [3, 4].

Полиморфноядерные нейтрофильные лейкоциты играют очень важную роль в защите организма от бактериальных и некоторых других патогенов [5–7]. Эти клетки составляют первую линию неспецифической противомикробной защиты. Они первыми мобилизуются в очаг воспаления, от их фагоцитарной активности зависит элиминация возбудителя. Цитопатогенное действие нейтрофилов связано главным образом с генерацией активных форм

кислорода (АФК). Под этим термином понимают резкое увеличение потребления кислорода за счёт преобразования его в АФК клетками-фагоцитами. Способность нейтрофильных гранулоцитов образовывать достаточное количество АФК может служить прогностическим признаком для оценки дальнейшего хода воспалительного процесса, а ответ на стандартный стимул может характеризовать активность защитных сил организма. Существуют различные способы оценки образования АФК, одним из наиболее чувствительных является хемилуминесцентный метод [8—10].

Несмотря на интенсивность исследований в данном направлении, остается всё ещё малоизученным весь спектр происходящих внутриклеточных событий, связанных с изменением фенотипических характеристик и функционированием нейтрофилов в норме и при патологии. Недостаточное понимание механизмов формирования дисфункций нейтрофилов при патологии в свою очередь обуславливает отсутствие патогенетически обоснованных подходов к регуляции функционирования данной клеточной популяции в эксперименте и клинике.

Целью исследования является оценка функциональной активности нейтрофильных гранулоцитов при воздействии метициллиночувствительных и устойчивых штаммов золотистого стафилококка (MSSA и MRSA).

Материал и методы

Объектами исследования служили штаммы *Staphylococcus aureus* устойчивые (MRSA, $n=17$) и чувствительные (MSSA, $n=17$) к действию оксациллина и нейтрофильные гранулоциты, выделенные из венозной крови. При взятии образцов патологического материала со слизистой оболочки носа и транспортировке их для дальнейших исследований использовались стерильные тумферы с коммерческой транспортной средой Эймса.

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

Микробную взвесь готовили методом прямого суспендирования из нескольких однотипных изолированных колоний стафилококков в стерильном изотоническом растворе натрия хлорида и доводили 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. После инкубации чашки просматривали. Появление видимого роста 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 так же, как на агар с оксациллином). Параллельно с исследуемыми культурами тестировали также контрольные штаммы метициллиночувствительных и метициллинорезистентных стафилококков.

Функциональную активность нейтрофильных гранулоцитов оценивали с помощью хемилуминесценции по методу De Sole P. et al. (1983). Из венозной крови обследуемого пациента выделяли нейтрофильные гранулоциты. Для этого к 5 мл крови с гепарином добавляли 1 мл полиглюкана и инкубировали в течение 30 мин при 37°C для ускорения осаждения эритроцитов. Надосадочную жидкость наслаивали на двойной градиент плотности фиколл-верографин ($\rho=1,077$ — для выделения популяции лимфоцитов, $\rho=1,199$ — для выделения популяции нейтрофильных гранулоцитов) и центрифугировали при 400 g в течение 45 мин. При контроле морфологического состава лейкоцитарных взвесей определяли чистоту выхода нейтрофильных гранулоцитов, которая составляла 97%. Полученную суспензию нейтрофильных гранулоцитов дважды отмывали в растворе Хенкса без фенолового красного по 10 мин при 400 g. Супернатант сливали, оставшиеся нейтрофильные гранулоциты разводили в 1 мл раствора Хенкса и получали взвесь. Подсчитывали количество нейтрофильных гранулоцитов в камере Горяева.

Для хемилуминесцентного анализа использовали 2×10^6 клеток. Измеряли величину спонтанной хемилуминесценции (СХЛ) нейтрофилов, которая характеризует базальный уровень активации этих клеток. Для определения резервных возможностей активации нейтрофилов осуществляли стимуляцию кислородного метаболизма посредством добавления к ним бактериальной суспензии из живой культуры MRSA или MSSA в концентрации 10^6 КОЕ/мл. В качестве усилителей люминесценции использовали люминол в концентрации 50 мкг/мл. Оценка спонтанной и индуцированной хемилуминесценции осуществлялась в течение 90 мин. на 36-канальном хемилуминесцентном анализаторе «CL3604» (Россия). Определяли следующие характеристики: время выхода на максимум (T_{max}), максимальное значение интенсивности (I_{max}), площадь под кривой (S_2). Усиление ХЛ, индуцированной зимозаном, оценивали по отношению площади индуцированной ХЛ к площади спонтанной ХЛ и определяли как индекс активации (ИА). Регистрация результатов и управление хемилуминесцентным анализатором осуществлялись с помощью компьютера.

Для всех полученных данных определяли медиану, а также 25 и 75 перцентили. Проверку гипотезы о статистической достоверности исследуемых параметров проводили с помощью критерия Манна-Уитни. Статистическую обработку результатов осуществляли с помощью пакета прикладных программ Statistica 6.0 (StatSoft, Inc.).

Результаты исследования

Активированные нейтрофильные гранулоциты являются мощными эффекторами, запускающими механизмы каскадных реакций, которые обеспечивают развитие воспаления. Противоинфекционное действие нейтрофильных гранулоцитов связано, главным образом, с генерацией активных форм кислорода, а одним из методов, позволяющих оценить кислородзависимую биоцидность нейтрофильных гранулоцитов, является хемилуминесцентный анализ [7].

В результате исследования хемилуминесцентной реакции нейтрофильных гранулоцитов в ответ на воздействие живой бактериальной культуры *Staphylococcus aureus*, в зависимости от устойчивости к оксациллину (MRSA и MSSA), были получены следующие результаты: выявлено увеличение времени выхода на пик (рис. 1),

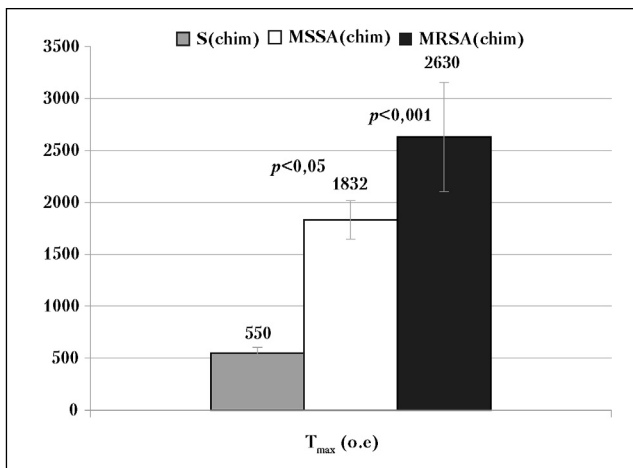


Рис. 1. Время выхода на пик (T_{max}) в спонтанном и индуцированном (MSSA и MRSA) хемилюминесцентных процессах.

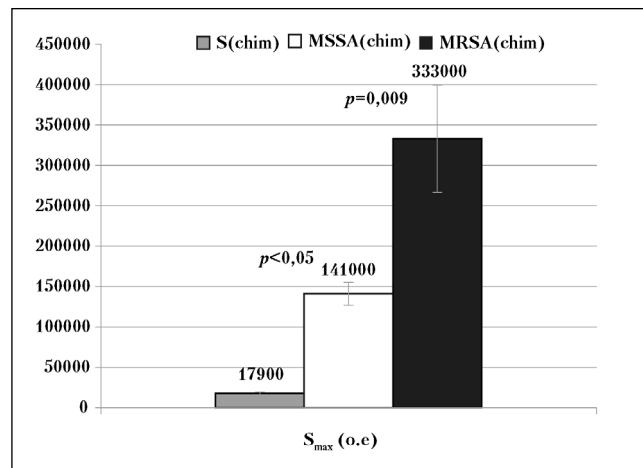


Рис. 3. Площадь под кривой (S_{max}) в спонтанном и индуцированном (MSSA и MRSA) хемилюминесцентных процессах.

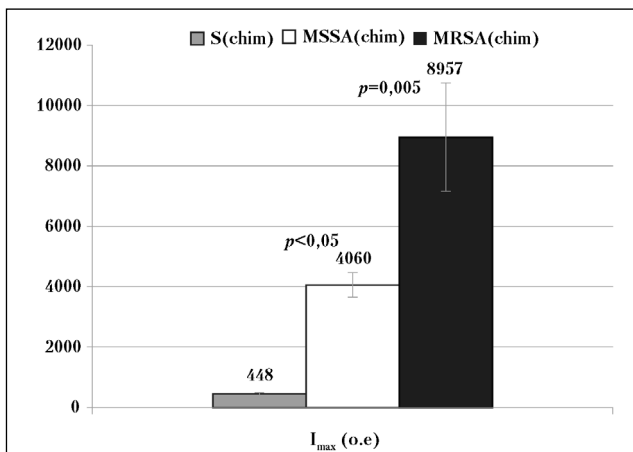


Рис. 2. Интенсивность (I_{max}) в спонтанном и индуцированном (MSSA и MRSA) хемилюминесцентных процессах.

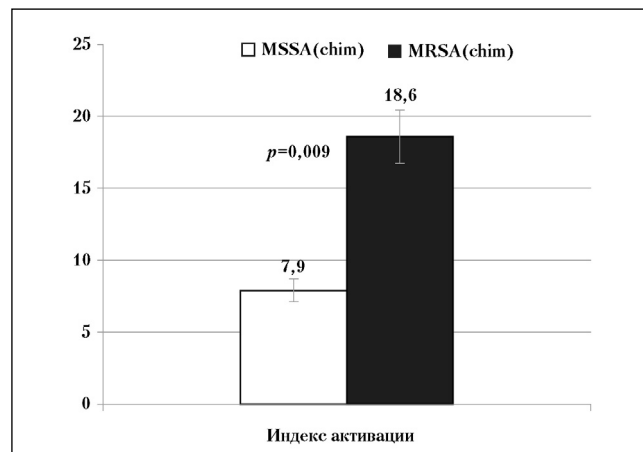


Рис. 4. Индекс активации (MSSA/S) и (MRSA/S) хемилюминесцентного процесса.

интенсивности хемилюминесцентной реакции (рис. 2) и площади под кривой (рис. 3) при воздействии MRSA и MSSA относительно спонтанной реакции. Также было установлено увеличение времени выхода на пик, интенсивности хемилюминесцентной реакции и площади под кривой, а также индекса активации (рис. 4) при воздействии живой культуры MRSA относительно MSSA ($p < 0,001$).

Нейтрофильные гранулоциты несут на своей поверхности широкий спектр рецепторов, часть из которых может взаимодействовать с неопсонизированными бактериями (CR- и Toll-рецепторы) [6]. Полисахаридная капсула, которая образуется у золотистого стафилококка, препятствует распознаванию рецептором CR1 нейтрофилов фрагментов C3-комплемента на поверхности *S.aureus*, что существенно снижает фагоцитоз, при этом прилипание и погло-

щение бактерии может происходить через CR3 рецептор, поскольку он обладает лектиноподобными свойствами и содержит поверхностные вещества, с помощью которых этот микроорганизм проникает внутрь клетки с образованием фаголизосомы [11]. Известно, что люминол способен проникать внутрь клетки и регистрировать весь пул образования АФК [8]. Установлено, что функциональная активность нейтрофилов здоровых лиц значительно изменяется при стимуляции праймирующей дозой стафилококков относительно спонтанной реакции. При индукции бактериальной культурой нейтрофильных гранулоцитов в процесс фагоцитоза включаются CR3 или Toll-подобные рецепторы, поддерживающие восприятие неопсонизированных микробных объектов, вместе с тем имеет значение и тот фактор, к какому виду принадлежат бактерии.

Заключение

Исследование хемилюминесценции нейтрофильных гранулоцитов в ответ на стимул в виде живых бактериальных культур (MRSA и MSSA) показало повышенную функциональную активность как в ответ на устойчивые бактериальные культуры стафилококка, так и на чувствительные штаммы. Следует отметить, что интенсивность кислородзависимого фагоцитоза была выше в ответ на MRSA, чем на MSSA. Обращает на себя внимание тот факт, что сте-

пень активации ферментов нейтрофильных гранулоцитов более выражена при контакте с MRSA, что коррелирует с бактерицидной способностью фагоцитов. Поэтому мы полагаем, что вирулентные штаммы золотистого стафилококка оказывают ингибирующее действие на активность ферментов кислородзависимой системы нейтрофилов. По-видимому, это следует отнести к одному из эффектов вирулентности штаммов *Staphylococcus aureus*.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Shahkarami F., Rashki A., Rashki Ghalehnoo Z., Jundishapur J.* Susceptibility and plasmid profiles of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and methicillin-susceptible *S.aureus*. *Microbiology* 2014 Jul; 7: 7.
2. *Yang Z., Fu Y., Liu B., Zhou E., Liu Z., Song X., Li D., Zhang N.* Ferrerol regulates antimicrobial peptide expression and reduces *Staphylococcus aureus* internalization into bovine mammary epithelial cells. *Microb Pathog* 2013 Dec; 65: 1–6.
3. *Genestet C., Le Gouellec A., Chaker H., Polack B., Guery B., Toussaint B., Stasia M. J.* Scavenging of reactive oxygen species by tryptophan metabolites helps *Pseudomonas aeruginosa* escape neutrophil killing. *Free Radic Biol Med* 2014 Aug; 73: 400–410.
4. *Swe P.M., Fischer K.* A scabies mite serpin interferes with complement-mediated neutrophil functions and promotes staphylococcal growth. *PLoS Negl Trop Dis* 2014 Jun 19; 8: 6.
5. *Воеводин Д.А., Розанова Г.Н., Стенина М.А.* Дисбактериоз и иммунопатологический процесс. *Журн микробиол эпидемиол иммунол* 2005; 2: 89–92.
6. *Швыдченко И.Н., Нестерова И.В., Синельникова Е.Ю.* Цитосекретирующая функция нейтрофильных гранулоцитов. *Иммунология* 2005; 1: 31–34.
7. *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 May 13; 111: 19.
8. *Рудой Б.А., Грачева Т.А., Рассанов В.П.* Использование метода регистрации хемилюминесценции нейтрофилов для оценки сенсбилизации лабораторных животных, иммунизированных бруцеллезной вакциной. *Иммунология* 2005; 3: 191–193.
9. *Konai M.M., Ghosh C., Yarlagadda V., Samaddar S., Haldar J.* Membrane active phenylalanine conjugated lipophilic norspermidine derivatives with selective antibacterial activity. *J Med Chem* 2014 Oct 21.
10. *Земсков А.М., Земсков В.М., Земсков М.А.* Проблема неспецифического и специфического в индукции и регуляции иммунологических реакций. *Журн микробиол эпидемиол иммунобиол* 2005; 4: 105–109.
11. *Коленчукова О.А.* Функциональная и метаболическая активность нейтрофильных гранулоцитов при остром бактериальном риносинусите. *Инфекц и иммун* 2013; 3: 269–274. <http://elibrary.ru/contents.asp?issueid=1145507&selid=20350050> 3.