

Отчет
о проведенных исследованиях по теме «Оценка действия НЭМИ на
активность процесса фагоцитоза стафилококков»

Тихомирова Е.И.

Известно, что важным этапом процесса фагоцитоза является киллинг поглощённых бактерий в фагоцитирующих клетках, обеспечиваемый кислородзависимыми и кислороднезависимыми механизмами, которые играют ведущую роль в уничтожении поглощенных микроорганизмов, и, в конечном итоге, в защите макроорганизма от инфекций (Ярилин, 1999, Мазуров, Дамбаева, Пинегин, 2000).

Кроме того, в работах ряда авторов было показано, что активированные макрофаги при культивировании *in vitro* выделяют целый ряд провоспалительных и регуляторных цитокинов, усиливающих способность макрофагов сдерживать размножение или уничтожить различные микроорганизмы. Цитокины, выделяемые на самых ранних стадиях инфекции, могут служить критерием, по которому можно определить тип последующего иммунного ответа.

Методика исследований

В опытах было использовано 16 лабораторных белых мышей весом 18-20 г., от которых получали перитонеальных экссудат для выделения перитонеальных макрофагов и изучения их фагоцитарной активности по отношению к бактериям. Готовили 4 объединенные пробы (макрофаги от 4 мышей): 1-я проба – макрофаги облучали плотностью мощности $0,005 \text{ мкВ/см}^2$ в течение 10 мин, 2-я проба – $0,05 \text{ мкВ/см}^2$ с той же длительностью, 3-я проба – $0,5 \text{ мкВ/см}^2$. и 4-я проба – контрольная (макрофаги без облучения).

Оценку функционально-метаболической активности макрофагов проводили постановкой цитохимического анализа (Берстон, 1965; Лецкий, 1970; Хейхоу, Кваглино, 1983). Цитохимические исследования осуществляли в мазках-препаратах из взвеси макрофагов после моделирования процесса фагоцитоза с бактериями (стафилококки) в течение 1 и 3 часов при температуре 37 С. Определяли содержание кислой и щелочной фосфатаз, миелопероксидазы, катионных белков в макрофагах с помощью стандартных тест-наборов производства НПФ «Абрис+» (г. Санкт-Петербург).

Определение содержания кислой фосфатазы (КФ) проводили методом азосочетания Берстона с использованием нафтол-AS-фосфата с диметилформамидом на цитратном буфере и парарозанилина в растворе азотистокислого натрия (Берстон М., 1965; Буйкис, Рубенс, 1969; Шубич, 1980).

Содержание щелочной фосфатазы (ЩФ) оценивали методом азосочетания по Кеплоу с использованием раствора α -нафтилфосфата на пропандиоловом буфере с раствором прочного синего RR (Karpow, 1955; Шубич, 1965; Буйкис, Рубенс, 1969; Шубич, Нагоев, 1980).

Содержание катионных белков (КБ) оценивали по методу Шубича с бромфеноловым синим (Шубич, 1974; Мазинг, Старосельская, 1981; Пигаревский, Мазинг, 1981; Нагоев, 1982).

Миелопероксидазу (МПО) определяли методом Грэхема-Кнолля с использованием в качестве субстрата перекиси водорода и бензидина (Бакуев, Саидов, 1991; Долгушин, Бухарин, 2001).

Учет результатов цитохимических исследований проводили путем световой микроскопии мазков под иммерсией с увеличением объектива $\times 90$ с использованием полуколичественного метода оценки результатов согласно принципу Астальди-Верга, основанному на выявлении различной степени интенсивности специфической окраски и расчета среднего цитохимического коэффициента (СЦК) для одной клетки (Astaldi, Verga, 1957).

Содержание основных противовоспалительных цитокинов – интерлейкина-1 α (ИЛ-1 α), интерлейкина-1 β (ИЛ-1 β), фактора некроза опухолей- α (ФНО- α), интерферона- γ (ИФН- γ) и интерлейкина-6 (ИЛ-6) – в среде культивирования макрофагов (в супернатанте) определяли методом иммуноферментного анализа (ИФА).

Определение ИЛ-1 α , ИЛ-1 β и ФНО- α осуществляли с помощью набора реагентов тест-системы производства ООО «Цитокин» (Санкт-Петербург). Результаты учитывали на спектрофотометре для микропланшетов при длине волны 490 нм (для ИЛ-1 α и ИЛ-1 β) и 492 нм (для ФНО- α). По значениям оптической плотности стандартного образца строили калибровочную кривую. Концентрацию ИЛ-1 и ФНО- α определяли по калибровочной кривой и оптической плотности образцов.

Определение ИФН- γ и ИЛ-6 проводили с помощью набора реагентов тест-системы « γ -Интерферон-ИФА-БЕСТ» и «ИЛ-6-ИФА-БЕСТ», производства ЗАО «Вектор-БЕСТ», г. Новосибирск. Далее учет результата проводили по общепринятой методике.

Статистическую обработку полученных данных проводили по общепринятым методикам.

Обсуждение экспериментальных данных – результатов исследования

Для оценки завершенности фагоцитоза и активности разных механизмов киллинга бактерий провели моделирование *in vitro* процесса фагоцитоза стафилококков в макрофагах белых мышей.

О кислороднезависимом киллинге бактерий судили по изменению активности кислой и щелочной фосфатаз (КФ и ЩФ), а также содержанию катионных белков (КБ) в цитоплазме макрофагов контрольных и облученных (всего 48 проб перитонеального экссудата).

В таблице 1 представлены результаты исследования функциональной активности перитонеальных макрофагов. Показано достоверное увеличение активности КФ и содержания КБ как в интактных макрофагах после облучения, так и через 1 ч фагоцитоза бактерий.

Таблица 1

Показатели кислороднезависимого киллинга бактерий
в макрофагах белых мышей

Режимы	Время фагоцитоза, ч	СЦК (M±m), усл.ед.		
		КФ	ЩФ	КБ
0,005 мкВ/см ²	0	1,95±0,18	0,69±0,08	1,64±0,12
	1	2,54±0,24	0,61±0,06	2,16±0,14
	3	2,16±0,18	0,54±0,08	1,62±0,12
0,05 мкВ/см ²	0	1,16±0,09	0,18±0,04	1,15±0,08
	1	1,38±0,12	0,36±0,09	1,38±0,12
	3	1,42±0,08	0,43±0,11	1,26±0,11
0,5 мкВ/см ²	0	1,45±0,16	0,48±0,08	1,44±0,08
	1	1,84±0,14	0,31±0,02	1,86±0,16
	3	1,66±0,12	0,24±0,02	1,52±0,12
Конт- роль	0	1,06±0,04	0,14±0,06	1,18±0,08
	1	1,16±0,06	0,42±0,12	1,32±0,12
	3	1,32±0,12	0,38±0,08	1,24±0,06

Примечания: * – наличие достоверных различий по отношению к контролю при уровне значимости $P < 0,05$; СЦК – средний цитохимический коэффициент; КФ – кислая фосфатаза; ЩФ – щелочная фосфатаза; КБ – катионные белки

Отмечено незначительное уменьшение содержания КФ и ЩФ в макрофагах, получивших облучение плотностью мощности 0,5 мкВ/см² в течение 10 мин.

Существенных различий активности ферментов КФ и ЩФ и содержания КБ через 1 и 3 ч фагоцитоза бактерий на фоне действия облучения 0,05 мкВ/см² по сравнению с контролем выявлено не было.

Анализируя полученные данные по активности основных факторов кислороднезависимого метаболизма макрофагов, можно сделать заключение о более выраженной активации кислой и щелочной фосфатаз и увеличении содержания катионных белков в процессе фагоцитоза стафилококков макрофагами белых мышей после действия излучения в режиме 0,005 мкВ/см².

Оценку внутриклеточного кислородзависимого метаболизма в макрофагах проводили с помощью цитохимической модификации НСТ-теста (Маянский, Виксман, 1979), использовали спонтанный и индуцированный бактериями варианты НСТ-теста. Данные представлены в таблице 2.

Сравнительный анализ полученных данных показал, что изменение показателей спонтанного и индуцированного НСТ-теста было сходным для

контрольных макрофагов и опытных и заключалось в интенсификации образования активных форм кислорода (АФК).

Таблица 2

Показатели спонтанного и индуцированного НСТ-теста при фагоцитозе бактерий макрофагами белых мышей

Режимы	СЦК (M±m), усл.ед.	
	спонтанный	Индуцированный
0,005 мкВ/см ²	0,94±0,12	1,26±0,14
0,05 мкВ/см ²	0,70±0,10	0,98±0,06
0,5 мкВ/см ²	0,65±0,11	0,82±0,12
Контроль	0,74±0,06	1,04±0,08

Примечания: * – наличие достоверных различий по отношению к контролю при уровне значимости P<0,05; СЦК – средний цитохимический коэффициент.

Более высокие значения отмечены для клеток, облученных в режиме 0,005 мкВ/см² мкВт. Следовательно, можно заключить о стимуляции активности «респираторного взрыва» в фагоцитирующих клетках. Это в свою очередь свидетельствует о повышении кислородзависимого метаболизма, обеспечивающего появление в клетке АФК и биоокислителей с сильным бактерицидным действием. Так, хорошо известен высокий уровень корреляции между образованием АФК и эффективностью киллинга бактерий фагоцитами. В связи с этим, определение «респираторного взрыва» является важным критерием способности нейтрофилов и макрофагов к завершеному фагоцитозу (Хаитов, Пинегин, 1995). При других режимах облучения значения были на уровне контроля и ниже.

Для характеристики другого кислородзависимого механизма киллинга бактерий макрофагами была изучена активность миелопероксидазы (МПО). Данные представлены в таблице 3.

Таблица 3

Активность миелопероксидазы в макрофагах белых мышей

Режимы	СЦК миелопероксидазы (M±m), усл.ед.		
	0 ч	1 ч	3 ч
0,005 мкВ/см ²	1,18±0,12	0,76±0,06	1,46±0,16
0,05 мкВ/см ²	0,86±0,08	0,56±0,08	1,24±0,12
0,5 мкВ/см ²	0,92±0,08	0,68±0,10	1,32±0,14
Контроль	0,82±0,06	1,28±0,12	1,36±0,18

Примечания: * – наличие достоверных различий по отношению к контролю при уровне значимости P<0,05; СЦК – средний цитохимический коэффициент.

Для макрофагов контрольной группы установлено увеличение активности МПО в процессе фагоцитоза стафилококков. Динамика

изменений в облученных макрофагах была сходной: через 1 ч фагоцитоза происходило снижение активности данного фермента, а к 3 ч – восстановление активности до исходных значений.

Сравнивая результаты оценки внутриклеточного кислородзависимого киллинга бактерий макрофагами белых мышей можно сделать заключение об усилении образования АФК и снижении активности фермента МПО в опытных макрофагах по сравнению с контрольными после облучения в режиме $0,005 \text{ мкВ/см}^2$ в течение 10 мин. Это, в свою очередь, свидетельствует о более активном уничтожении и разрушении поглощенных бактерий.