

УДК 616-002.71:612.112:546.172.6

Н.Г. Плехова, С.В. Охотина, Е.И. Дробот,
Л.М. Сомова

НИТРОКСИДОБРАЗУЮЩАЯ АКТИВНОСТЬ НЕЙТРОФИЛОВ ПРИ ПСЕВДОТУБЕРКУЛЕЗНОЙ И ЛИСТЕРИОЗНОЙ ИНФЕКЦИЯХ

НИИ эпидемиологии и микробиологии СО РАМН
(г. Владивосток)

Ключевые слова: оксид азота, нейтрофилы, *Yersinia pseudotuberculosis*, *Listeria monocytogenes*.

Несмотря на довольно длительный период активного внимания к биологической роли оксида азота, значение этой молекулы в бактерицидной активности фагоцитирующих клеток остается не до конца изученной. В отечественных работах сведения о состоянии нитроксидзависимых механизмов микробицидности фагоцитов при инфекционных заболеваниях немногочисленны, а в зарубежных они в основном посвящены значению оксида азота в обеспечении бактерицидности моноцитов/макрофагов [7, 11]. Поскольку фагоциты человека, и особенно нейтрофилы, генерируют небольшое количество оксида азота, роль микробицидного нитроксида у человека остается спорной [3, 9]. Так, существует мнение, что прямая токсичность этой молекулы в нейтрофилах не является существенной, но она способна значительно усиливать реактивность кислородного радикала супероксида за счет формирования пероксинитрита [4].

Образование оксида азота происходит с участием специфической NO-синтазы (NOS), которая участвует в реакции окисления неароматической аминокислоты L-аргинина при помощи тетрагидриобиптерина [5, 11]. В результате этой реакции образуются соединения реактивного оксида азота, способного реагировать с кислородом и образовывать более сильные окислители, например двуокись азота. Так как известно, что образование метаболитов в цикле оксида азота может идти различными путями, то гистохимическое определение активности NOS не всегда отражает истинную его продукцию [1]. Поэтому необходимо сочетанное использование метода определения нитратов/нитритов, метода гистохимического определения активности NOS, а также ее локализации в нейтрофилах с помощью моноклональных антител [2]. Кроме того, на настоящий момент известно различие в активности нитроксидзависимой системы в нейтрофилах человека и животных [10]. В связи с вышесказанным целью настоящей работы явилось исследование активности нитроксидзависимой системы нейтрофилов человека и животных при одинаковых условиях стимуляции, а именно при заражении этих клеток *Yersinia pseudotuberculosis* и *Listeria monocytogenes*.

Первичную культуру нейтрофилов воспалительного экссудата получали путем предварительного (за

9 часов) внутрибрюшинного введения мышам 10% мясопептонового бульона. Для экспериментов готовили концентрацию клеток 2×10^6 на 1 мл среды 199, содержащей эмбриональную сыворотку коровы, глутамин, гентамицин и пенициллин [6]. Качество культуры оценивалось методом прижизненного наблюдения с помощью фазово-контрастной микроскопии. Нейтрофилы невоспалительного экссудата морских свинок и популяцию нейтрофилов людей-доноров получали путем наслоения на растворы фикола и урографина с различной плотностью (1,117 и 1,077).

Метаболиты оксида азота определяли как в интактных, так и в зараженных *Y. pseudotuberculosis* и *L. monocytogenes* нейтрофилах (соотношение – 10 бактерий на 1 фагоцит) после 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 и 9 часов инкубации. Для стимуляции монослой нейтрофилов предварительно (16 часов) инкубировали в среде 199, содержащей 500 МЕ человеческого γ -интерферона, после чего вносили бактерии.

Содержание метаболитов оксида азота определяли спектрофотометрически с использованием Griess реактива, который включал равные объемы 0,1% N-(1-naphthyl-ethylenediamine dihydrochloride) и 1% p-aminobenzene-sulfanilamide, на основе 2,5% раствора фосфорной кислоты [12]. Показатели выражали в виде индекса стимуляции, который был равен отношению разности между средними значениями оптической плотности опытного образца с контрольным, умноженному на 100. Индекс стимуляции в контроле составлял 0%.

Активность NOS определяли с помощью гистохимического метода В.Т. Норе и S.R. Vinsent [8]. Клеточный монослой фиксировали в парах формалина в течение 10 мин, отмывали в двух сменах 0,15 M tris-HCl-буфера (pH 8,0) с добавлением сахарозы (15%) по 10 мин, после чего инкубировали 1 час при 37°C в среде, содержащей 0,5 мМ β -nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH), 0,5 мМ НСТ и 0,3% тритон X-100 на основе 0,15 M tris-HCl-буфера (pH 8). Контрольные препараты помещали в среду с добавлением ингибитора – 10 мМ N^o-нитро-L-аргинина. Для оценки внутриклеточного содержания фермента использовался полуколичественный метод Астальги–Верга.

Установлено, что в интактных нейтрофилах доноров уровень метаболитов оксида азота значительно повышался в срок от 5 до 7 часов контакта клеток с пластиком. Индекс стимуляции находился в пределах от $15,09 \pm 0,7$ до $32,7 \pm 0,4\%$, после чего снижался, составляя через 9 часов $11,4 \pm 0,2\%$. При предварительной стимуляции нейтрофилов человека γ -интерфероном отмечались более высокие концентрации метаболитов оксида азота вплоть до конца срока наблюдения – до $76,16 \pm 0,8\%$ (рис. 1, а). В интактных нейтрофилах невоспалительного перитонеального экссудата животных контакт в течение 60 мин с пластиковой пробиркой вызывал резкое повышение уровня метаболитов (до $40,04 \pm 1,56\%$), с последующим

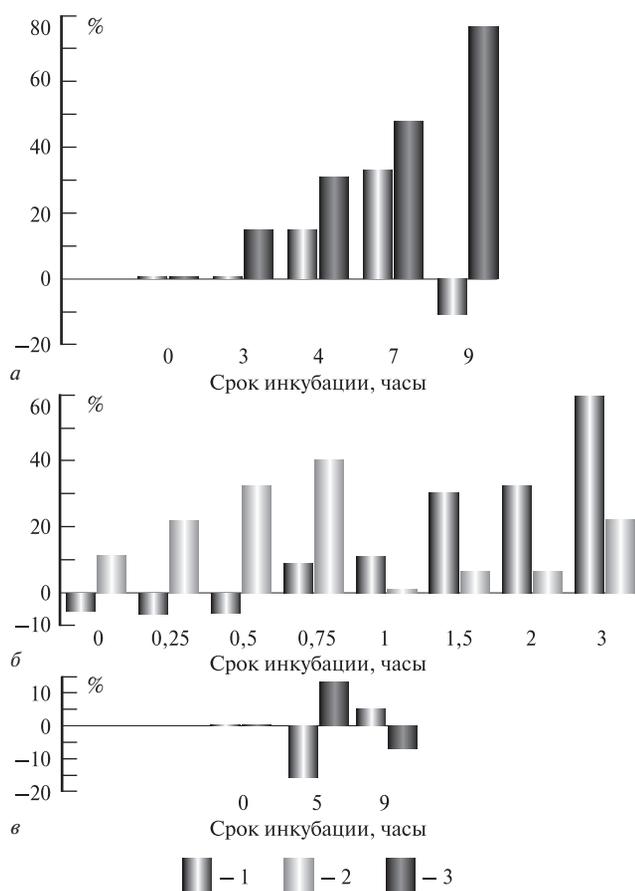


Рис. 1. Содержание метаболитов оксида азота в интактных нейтрофилах доноров (а), невоспалительного (б) и воспалительного (в) экссудата мышей и морских свинок.

1, 2 – нестимулированные; 3 – стимулированные γ -интерфероном нейтрофилы.

снижением до значений контроля (рис. 1, б). Внутриклеточное содержание метаболитов в интактных нейтрофилах первичной культуры мышей снижалось к 5-му часу инкубации до $15,55 \pm 0,65\%$, тогда как, при внесении γ -интерферона повышалось до $13,77 \pm 1,5\%$, уменьшаясь к 9 часам до $6,72 \pm 0,51\%$ (рис. 1, в).

Таким образом, результаты экспериментов на различных моделях указывают на неоднозначную реакцию нитроксидобразующей системы при различном физиологическом состоянии нейтрофилов. Выявлено повышение продукции метаболитов оксида азота клетками человека и морских свинок при адгезии клеток, что подтверждает данные С. D. Wright et al. [14]. Нейтрофилы же воспалительного экссудата животных показывают противоположную реакцию.

После определения нитроксидобразующей активности интактных клеток на различных моделях было исследовано образование метаболитов оксида азота в нейтрофилах при их заражении бактериями *in vitro*. При контакте нейтрофилов человека с *Y. pseudotuberculosis* отмечалось два периода повышения уровня метаболитов оксида азота: первый от 30 до 60 мин – до $31,3 \pm 0,52\%$ и второй от 5 до 7 часов – до $20,2 \pm 0,3\%$ (рис. 2, а). В ответ на заражение *L. monocytogenes* повышение индекса стимуляции

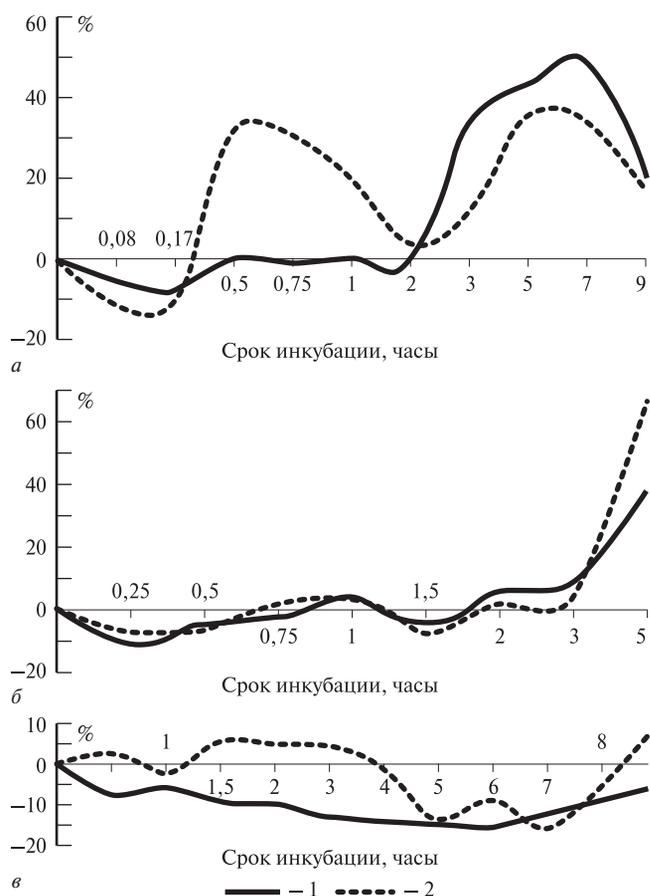


Рис. 2. Количество метаболитов оксида азота в зараженных бактериями нейтрофилах человека (а), невоспалительного (б) и воспалительного (в) экссудата животных.

1 – нейтрофилы, инфицированные *L. monocytogenes*; 2 – нейтрофилы, инфицированные *Y. pseudotuberculosis*.

относительно контроля происходило в период от 3 до 9 часов, и его максимальное значение составило $44,4 \pm 0,52\%$ (7 часов). При предварительной стимуляции нейтрофилов γ -интерфероном максимальное повышение уровня метаболитов оксида азота в человеческих фагоцитах, зараженных *Y. pseudotuberculosis*, отмечалось через 6 часов ($144,18 \pm 5,48\%$), а в ответ на заражение *L. monocytogenes* – через 7 часов контакта ($88,9 \pm 0,2\%$). В дальнейшие сроки индекс стимуляции снижался и к 9 часам составил $104,01 \pm 0,25$ и $71,24 \pm 1,24\%$ соответственно.

При внесении указанных видов бактерий в культуру нейтрофилов невоспалительного экссудата морских свинок в первые 2 часа отмечалось уменьшение концентрации метаболитов оксида азота по сравнению с контролем (рис. 2, б). Последующее повышение показателей, по нашему мнению, связано с размножением бактерий, что и было подтверждено при исследовании уровня метаболитов в соответствующих бактериальных суспензиях в эти сроки (данные не представлены).

В нейтрофилах воспалительного экссудата животных значительное повышение внутриклеточного содержания метаболитов оксида азота отмечалось в период от 25 до 60 мин контакта с *Y. pseudotuberculosis*

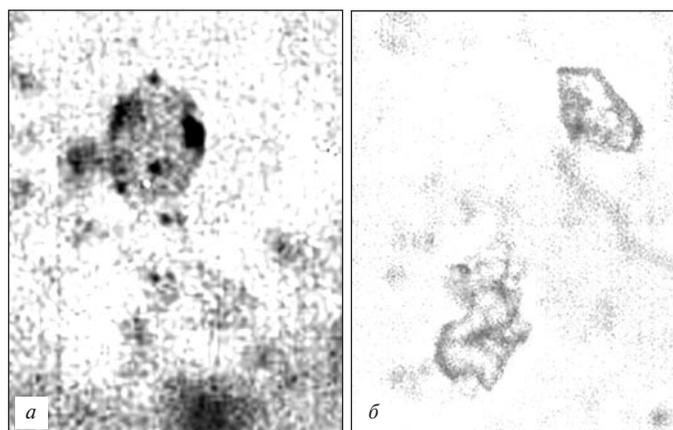


Рис. 3. Активность NO-синтазы.

а – наличие активности в нейтрофилах, зараженных *Y. pseudotuberculosis*, 60 мин контакта; *б* – отсутствие реакции после инкубации с ингибитором. Метод Норе и Vinsent, $\times 1200$.

(рис. 2, в). Максимальное значение индекса стимуляции составило $27,26 \pm 0,064\%$ (45 мин). В дальнейшем концентрация метаболитов снижалась. При контакте с *L. monocytogenes* повышение их уровня было менее значительным. При стимуляции нейтрофилов γ -интерфероном выявлено снижение уровня метаболитов оксида азота относительно контроля как при заражении *Y. pseudotuberculosis*, так и *L. monocytogenes*. Необходимо отметить, что полученные данные свидетельствовали о более выраженной реакции нитроксидазависимого бактерицидного комплекса нейтрофилов в ответ на заражение *Y. pseudotuberculosis*.

Гистохимическое исследование активности NOS в нейтрофилах, зараженных бактериями, показало, что динамика ее внутриклеточного содержания была подобна динамике продукции клетками метаболитов оксида азота (рис. 3). Максимальное количество NOS-положительных клеток составило $49,0 \pm 6$ и $66,0 \pm 5\%$ через 25 мин и 6 часов контакта нейтрофилов с *Y. pseudotuberculosis* и *L. monocytogenes* соответственно.

Таким образом, полученные результаты показывают, что нитроксидазавывающая активность нейтрофильных лейкоцитов зависит от их физиологического состояния. Если в ответ на адгезию к пластику в клетках доноров отмечалось повышение продукции оксида азота только через 4 часа контакта, то в нейтрофилах перитонеального экссудата животных – уже через 15–30 мин. Подобные данные были получены С.Д. Wright et al. при исследовании способности адгезированных нейтрофилов человека к синтезу нитритов [14]. Необходимо отметить, что в клетках воспалительного экссудата мышей, напротив, выявлялось снижение внутриклеточного содержания нитритов. По нашему мнению, это связано с предварительной стимуляцией нитроксидазавывающей активности нейтрофилов в процессе их миграции к месту воспаления.

Исследование внутриклеточного содержания NOS показало аналогичную зависимость активности фермента от физиологического состояния ней-

трофилов. Необходимо отметить, что некоторыми исследователями указывалось на отсутствие синтеза индуцибельной NOS и продукции нитритов в интактных нейтрофилах крови человека и крысы [13]. При этом отмечалось, что только в нейтрофилах воспалительного экссудата крыс продуцировались нитриты. На этом основании авторами был сделан вывод о различных путях активации гена экспрессии индуцибельной NOS в нейтрофилах человека и крыс. Тем не менее так как с помощью гистохимического метода на собственном материале была выявлена значительная активность NOS как в нейтрофилах человека, так и в нейтрофилах мышей, зараженных *Y. pseudotuberculosis* и *L. monocytogenes*, мы считаем возможным связать это с активацией нитроксидазавывающей способности нейтрофилов при контакте с бактериями. На повышение активности NOS в экстравазальных нейтрофилах человека при бактериальных инфекциях указывали и другие авторы [13].

Продукция оксида азота в нейтрофилах выявлялась также при предварительной инкубации клеток с провоспалительным цитокином – γ -интерфероном, причем в нейтрофилах человека она была более выраженной. Повышение внутриклеточного содержания NOS можно объяснить тем, что в нейтрофилах присутствуют как конститутивная, так и индуцибельная ее формы, которые суммарно могут проявлять свою активность в интактных и стимулированных клетках [13].

Литература

1. Реутов В.П., Сорокина Е.Г., Охотин В.Е., Косицын Н.С. Циклические превращения оксида азота в организме млекопитающих. – М.: Наука, 1997.
2. Albina J.E. // *J. Leukocyt. Biol.* – 1995. – Vol. 58. – P. 643–649.
3. Andonegui G., Trevani A.S., Gamberale R. et al. // *J. Immunol.* – 1999. – Vol. 162. – P. 2922–2930.
4. Beckmann J.S., Koppenol W.H. // *Am. J. Physiol.* – 1996. – Vol. 271. – P. C. 1424–C1437.

5. Bryant J.L., Mehta P., Vonderporten A., Mehta J.L. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* — 1992. — Vol. 189. — P. 558–563.
6. Evans T.J., Buttery L.D.K., Carpenter A. et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 1996. — Vol. 93, No. 18. — P. 9553–9558.
7. Fang F.C. // *J. Clin. Invest.* — 1997. — Vol. 99, No. 12. — P. 2818–2825.
8. Hope B.T., Vinsent S.R. // *J. Histochem. Cytochem.* — 1989. — Vol. 37. — P. 653–661.
9. Klebanoff S.J., Nathan C.F. // *J. Leukoc. Biol.* — 1993. — Vol. 197, No. 1. — P. 192–196.
10. Miles A.M., Owens M.W., Milligan S. et al. // *J. Clin. Invest.* — 1992. — Vol. 90, No. 2. — P. 631–636.
11. Nathan C., Shiloh M. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 2000. — Vol. 97, No. 16. — P. 8841–8848.
12. Schulz K., Kerber S., Kelm M. // *J. Nitric Oxide.* — 1999. — Vol. 3, No. 3. — P. 225–234.
13. Wheeler M.A., Smith S.D., Garcia-Cardena G. et al. // *J. Clin. Invest.* — 1997. — Vol. 99. — P. 110–116.
14. Wright C.D., Mulsch A., Busse R., Osswald H. // *Bio-*

chem. Biophys. Res. Commun. — 1989. — Vol. 160, No. 2. — P. 813–819.

Поступила в редакцию 19.06.2006.

NITRIC OXIDE-GENERATING ACTIVITY OF NEUTROPHILS IN CASE OF PSEUDOTUBERCULOUS AND LISTERIOUS INFECTIONS

N.G. Plekhova, S.V. Okhotina, E.I. Drobot, L.M. Somova SBRAMS Research Institute of Epidemiology and Microbiology (Vladivostok)

Summary — The authors studied nitric oxide-generating activity of neutrophils of various biological models infected in vitro with *Y. pseudotuberculosis* and *L. monocytogenes*, and revealed differences in nitric oxide production, depending on physiological state of neutrophils and type of bacteria. In case of cell adhesion, the authors observed increasing intracellular content of nitric oxide metabolites in human neutrophils and noninflammatory animals' exudates (guinea pigs and mice). The neutrophils found in inflammatory exudates responded contrariwise. In response to infection with *Y. pseudotuberculosis*, the nitric oxide-dependent bactericidal set of cells exhibited a high-grade sensitivity, as compared to that with *L. monocytogenes*.

Pacific Medical Journal, 2007, No. 4, p. 47–50.

УДК 616-002.72-031.81-091

Ю.В. Каминский, В.С. Тимошенко, О.Г. Полушин, В.И. Колесников

ИНВАЗИВНЫЕ И ГЕНЕРАЛИЗОВАННЫЕ МИКОЗЫ

ПО МАТЕРИАЛАМ ПРИМОРСКОГО ИНСТИТУТА РЕГИОНАЛЬНОЙ ПАТОЛОГИИ

Владивостокский государственный медицинский университет,
Приморский институт региональной патологии
(г. Владивосток)

Ключевые слова: микозы, патоморфология.

Существует более 100 000 видов грибов, объединенных в 20 классов. У человека выделяют дерматомикозы и висцеральные микозы. Висцеральные микозы делят на 4 группы: заболевания, вызываемые лучистыми, дрожжеподобными, плесневыми и прочими грибами. В практической работе целесообразно разделять экзогенные микозы (северо- и южно-американские бластомикозы, кокцидиоидомикоз, гистоплазмоз, риноспороидоз, нокардиоз), когда обнаружение грибка в тканях позволяет с определенностью говорить о наличии болезни, и группу грибковых инфекций, представители которых могут быть сапрофитами и лишь при определенных условиях становятся патогенными для человека. К последним относят кандидоз, европейский бластомикоз (криптококкоз), плесневые микозы (аспергиллез, мукомикоз, пенициллез), актиномикоз. Говорить о болезни, обусловленной этими грибами, можно только тогда, когда в ткани обнаруживаются вегетирующие формы гриба (почкование, мицелий) и отмечается хотя бы слабовыраженная воспалитель-

ная реакция или фагоцитоз элементов гриба [12]. На современном этапе отмечается увеличение заболеваемости инвазивными и генерализованными формами микозов [3, 7, 9, 11, 13].

Нами проанализированы протоколы вскрытий, проведенных в Приморском институте региональной патологии за 1991–2007 гг. Участие грибковой микрофлоры в этиологической панораме инфекционных осложнений у ВИЧ-инфицированных является аксиомой. В большинстве подобных аутопсий (120 наблюдений) мы нашли разнообразные активные формы сапрофитных грибов и их комбинаций. Выявление же активных микозных поражений при аутопсиях из соматических стационаров до последнего времени было редкостью. При анализе 6000 протоколов вскрытий трупов больных, умерших в стационарах общего профиля, доля диагностики инвазивных или генерализованных микозов за 1991–1995 гг. составила 3%. В 1996–2000 гг. этот показатель увеличился до 7%, а в 2001–2006 гг. — до 17%. За неполный же 2007 г. на 200 вскрытий пришлось 5 микозов. Такая же тенденция отмечена и при анализе биопсийного материала: аспиратов из носа и его пазух, соскобах и операционных фрагментах гинекологического материала, щипковых биопсиях из бронхов, пищевода и желудка.

В литературе увеличение заболеваемости микозами во многих странах объясняют иммунодепрессивной терапией, применением антибиотиков, гормональных препаратов, дисбактериозами и др. [1, 2, 7, 13, 14]. В наших наблюдениях, кроме упомянутых причин, отмечалась связь с наркоманией, алкоголизмом, кахексией, плохим питанием и даже бытовыми условиями. Особую группу составляют больные, получившие ятрогенное обсеменение грибами при искусственной вентиляции легких или установке катетеров