

## ЭФФЕКТОРНАЯ ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ НЕЙТРОФИЛОВ ПАЦИЕНТОВ С ГЕНЕРАЛИЗОВАННОЙ СТАФИЛОКОККОВОЙ ИНФЕКЦИЕЙ

Барзбиева С. М., Хараева З. Ф., Нагоева М. Х., Шогенова А. Р.

ФГБОУ ВПО «Кабардино-Балкарский государственный университет им Х. М. Бербекова», Нальчик, e-mail: A\_Nagoev@mail.ru

Несмотря на достижения современной антибиотикотерапии, продолжает оставаться актуальной проблема генерализованной инфекции. Исследованы показатели нитрат-нитритов и супероксиданион радикала в плазме крови больных с генерализованной стафилококковой инфекцией. Обнаружено, что процессы радикалообразования у пациентов превышают норму в 15–18 раз и, несмотря на проводимую терапию и положительную клиническую динамику, не нормализуются к 14–30 суткам. Показатели больных с тяжелым сепсисом были достоверно выше по сравнению с показателями пациентов с синдромом системного воспалительного ответа. Выявленное длительно сохраняющееся состояние повышенного радикалообразования является одним из факторов риска развития осложнений. При изучении фагоцитарных показателей при генерализованной стафилококковой инфекции обнаружено, что эффективность фагоцитоза значительно снижена. Страдает как поглотительная активность нейтрофилов, так и переваривающая их способность.

Ключевые слова: сепсис, стафилококковые инфекции, свободные радикалы, нитрат-нитриты, супероксиданион радикал.

## EFFECTOR FUNCTIONAL ACTIVITY OF NEUTROPHILS OF PATIENTS WITH THE GENERALIZED STAPHYLOCOCCAL INFECTION

Barazbiyeva S. M., Harayeva Z. F., Nagoeva M. H., Shogenova A. R.

FGBOU VPO "Kabardino-Balkarian state university him H. M. Berbekova", Nalchik, e-mail: A\_Nagoev@mail.ru

Despite advances in modern antibiotic therapy, remains an urgent problem of generalized infection. The level of nitrate-nitrites and superoxide radical in plasma of patients with generalized staphylococcal infections were studied. The generation of free radicals were much more high than normal dates at 15–18 times, despite ongoing therapy and the positive clinical dynamic. These indicators of oxidative processes were not normalized at 14–30 day. Characteristics of patients with severe sepsis were significantly higher compared with the indices of the patients with systemic inflammatory response syndrome. Identified long lasting heightened radical production is one of the risk factors for complications. When studying the phagocytic indices in a generalized staph infection found that the efficiency of phagocytosis is greatly reduced. Suffering as the absorption activity of neutrophils, and their digestive ability.

Keywords: sepsis, staphylococcal infection, free radicals, nitrat-nitrite, superoxide anion radical.

Нейтрофилы, составляющие около  $\frac{2}{3}$  всех лейкоцитов и способные функционировать в гипоксических очагах из-за наличия системы анаэробного гликолиза, являются одним из важнейших элементов неспецифической защиты организма. Нейтрофилы, составляющие около  $\frac{2}{3}$  всех лейкоцитов и способные функционировать в гипоксических очагах из-за наличия системы анаэробного гликолиза, являются одним из важнейших элементов неспецифической защиты организма. Нейтрофилы способны к радикалообразованию, что является одним из важнейших антимикробных механизмов.

Оксид азота (NO) – нетипичная сигнальная молекула, неорганическое, газообразное соединение со свойствами радикала ( $\cdot\text{N}=\text{O}$ ), имеет неспаренный электрон, что придает ему высокую реакционную способность [3,4]. Показано, что NO присутствует в клетках и тканях человека и животных [1,4]. Радикал NO может реагировать в биологических системах с

кислородом, супероксидным анион-радикалом и ионами металлов переходной валентности. В связи с этим функциональный ответ клетки на действие NO многообразен и в значительной степени зависит не только от фенотипа клетки-мишени, но и от количества NO в клетке и окружающих молекул. Время жизни не превышает 6–10 секунд, после чего он превращается при участии кислорода и воды в нитраты и нитриты [3,4,7,8].

По данным ряда авторов молекулярный мессенджер – оксид азота играет важную роль в протекающих в организме физиологических и патофизиологических процессах [1,2,5,9]. Он участвует в регуляции функций сердечно-сосудистой, иммунной систем, антиопухолевых процессах. Вместе с тем оксид азота обладает и противомикробным действием, участвуя в защите макроорганизма от инфекционного агента [2]. Очевидно, что NO не единственный антипатогенный эффектор иммунной защиты, однако в значительном большинстве случаев он является либо индуктором, либо исполнителем бактерицидной программы. В случае образования больших количеств NO происходит реакция с супероксидным радикалом, образуя другую активную форму кислорода – пероксинитрит ( $\text{ONOO}^-$ ) [3-6]. Пероксинитрит обладает гораздо большей реакционной способностью, чем NO или супероксидрадикал, неэнзиматически участвует в продукции гидроксильных радикалов, включая, таким образом, молекулу NO в образование новых активных форм кислорода. Показан и прямой цитотоксический эффект пероксинитрита на культуре клеток [5].

Основными медиаторами являются: фактор некроза опухоли - $\alpha$ , интерлейкины -1,6, фосфолипаза A2, эластаза, селектины, активные формы кислорода, оксид азота и др. Гиперактивация иммунной системы, сопровождающаяся выбросом цитокинов в первую фазу системной воспалительной реакции, приводит к ее быстрому истощению и развитию иммунодефицитного состояния.

Современное лечение сепсиса – это балансирование на грани сверхвысоких доз антибактериальных препаратов и их токсико-аллергических осложнений, плазмоферез с последующей заместительной терапией компонентов плазмы и иммуностимулирующая терапия [2,10-13]. В идеале терапия должна защищать иммунную систему хозяина как от гиперактивации, так и от истощения. С учетом комплексного действия медиаторов воспаления только комбинированная терапия может быть эффективной при системной воспалительной реакции и предотвращать полиорганную недостаточность. Изменение терапевтического подхода – помимо методов и средств антимикробного воздействия, включает и модуляцию системного воспалительного ответа (нейтрализация и/или аттенуация эффекта септических медиаторов). Однако для изменения терапевтического подхода необходимо знание тонких молекулярных механизмов патогенеза генерализованной инфекции.

Знание функций и регуляторных связей NO<sup>•</sup> проясняет важные проблемы патогенеза стафилококковой инфекции. Успешное использование новых данных о регуляции синтеза и функционирования NO<sup>•</sup> позволяет надеяться на появление нового перспективного направления в профилактике и лечении многих заболеваний, в том числе инфекционной этиологии. В связи с вышеизложенным, целью данной работы было динамическое исследование содержания оксида азота и супероксиданион радикала у больных с генерализованной стафилококковой инфекцией.

### **Материалы и методы**

Больные наблюдались в отделениях реанимации и хирургии городской клинической больницы г. Нальчика и Республиканском Центре Инфекционных болезней г. Нальчика. Обследовано 35 больных в возрасте от 21 до 56 лет с сепсисом стафилококковой этиологии, из них 23 мужчин и 22 женщин.

Больные были ретроспективно разделены на 2 подгруппы согласно классификации Bone [6]: первую группу составили 25 человек с синдромом системного воспалительного ответа (сепсис), вторую группу 10 больных с тяжелым сепсисом. Группа доноров состояла из 15 доноров Республиканской станции переливания крови г. Нальчика и была сопоставлена по полу, возрасту с группами больных. Лица, имеющие сопутствующие заболевания и отклонения в анализах крови, были исключены из группы доноров.

В периферической крови в остром периоде у больных с тяжелым сепсисом наблюдался лейкоцитоз ( $15-28 \times 10^9/\text{л}$ ) или лейкопения ( $3,0-3,5 \times 10^9/\text{л}$ ), со сдвигом формулы влево до юных форм, СОЭ достигала  $60 \pm 15$ . У трех больных выявлена анемия: гемоглобин  $70 \pm 15$ , эритроциты  $3,2 \pm 0,3 \times 10^{12}$ . При микробиологическом исследовании крови в 100 % случаев был высеян *S.aureus* в виде монокультуры.

Общую концентрацию нитратов и нитритов в плазме крови больных и здоровых доноров (мкМ) определяли спектрофотометрически с использованием реактива Гриса (Nitrate/Nitrite Colorimetric Assay Kit) (Cayman, USA). Для этого в каждую пробу добавляли разбавленную в два раза буфером (Assay buffer) плазму крови, и 10 мкл ферментного кофактора и 10 мкл нитрат редуктазы. Инкубировали 1 час при комнатной температуре и вносили 50 мкл реактива Гриса R1 и 50 мкл реактива Гриса R2. Инкубировали 10 минут при комнатной температуре, измеряли оптическую плотность при 540 нм.

Продукцию супероксид радикала нейтрофилами периферической крови больных и здоровых доноров определяли по реакции восстановления цитохрома c, показатель генерации супероксид радикала выражали в нМ/мин, с учетом показателя экстинкции восстановления цитохрома c ( $\epsilon = 21 \text{ мМ}^{-1} \text{ см}^{-1}$ ). Фагоцитарную активность нейтрофилов оценивали стандартным методом в отношении бактерий *Staphylococcus aureus*, выделенных у каждого

больного. Для этого смешивали 1 мл суспензии нейтрофилов и 1 мл взвеси бактерий ( $10^7$  кл) в растворе Хенкса (рН 7.4). Смесь инкубировали при помешивании 30 мин при 37 °С. Приготавливали мазки на стекле, фиксировали и окрашивали по Романовскому – Гимзе. В мазках на 100 клеток подсчитывали количество фагоцитирующих макрофагов. Полученные данные выражали в виде фагоцитарного индекса и фагоцитарного числа.

Для выделения нейтрофилов использовали венозную кровь, взятую утром натощак путем пункции локтевой вены больных и доноров в строго асептических условиях. Кровь собирали в стерильные силиконизированные пробирки, содержащие 1.0 мл антикоагулянта. Количество используемой крови на одно исследование составляло от 5 до 10 мл. Нейтрофилы выделяли по стандартной методике на двойном градиенте плотности. Для этого в силиконизированные пробирки поэтапно наслаивали равные объемы растворов фиколл-верографина (удельная плотность 1.199 гр\см<sup>3</sup> и 1,080 гр\см<sup>3</sup>) и периферическую кровь. Затем пробирки центрифугировали в течение 40 минут при 800 g в центрифуге с горизонтальным ротором. После центрифугирования нейтрофилы концентрировались в интерфазном кольце. Взвесь нейтрофилов пренесли в силиконизированные пробирки и дважды отмывали раствором Хенкса (рН 7.4). Режим центрифугирования 10 минут при 400g. Подсчитывали и доводили до рабочей концентрации.

Оценку эффективности внутриклеточного киллинга оценивали по методу Nilsen S. [8]. После постановки фагоцитарной реакции взвесь центрифугировали 10 минут при 1500g, отбирали осадок, добавляли трехкратный объем H<sub>2</sub>O и производили высеv по методу Гольда на чашку Петри с мясо-пептонным агаром. Число выживших после фагоцитоза бактерий определяли по количеству колоний в секторах через 24 часа.

Полученные результаты обрабатывали с использованием общепринятых статистических методов.

### **Результаты исследования**

Генерация радикалов фагоцитарными клетками играет защитную роль и направлена на уничтожение инфекционного агента и, как правило, повышается в острую фазу воспаления. В обеих подгруппах больных с генерализованной стафилококковой инфекцией выявлено, что нейтрофилы в подгруппе больных с сепсисом продуцируют более чем в двенадцать раз превосходящие нормальные количества супероксидного аниона, в группе больных с тяжелым сепсисом количество продуцируемого супероксид аниона превосходит нормальный показатель более чем в 15 раз. Уровень нитратов и нитритов в плазме крови выше нормы в 15 (подгруппа больных с сепсисом) и в 18 раз (подгруппа больных с тяжелым сепсисом) ( $p < 0,001$ ) (табл.1).

Таблица 1

Радикалообразующая способность нейтрофилов больных с генерализованной стафилококковой инфекцией в динамике инфекционного процесса (x±m)

Группа пациентов	Число больных	Восстановление цитохрома с, (нМ\мин)					Концентрация нитратов и нитритов в 1 мл плазмы, (мкМ)				
		1	2	7	14	30	1	2	7	14	30
Больные с ССВО	25	12,2 ±0,3 <sup>1</sup>	12,0 ±0,4 <sup>1</sup>	9,3 ±0,3 <sup>1,3</sup>	7,2 ±0,1 <sup>1,3</sup>	5,1 ±0,3 <sup>1,3</sup>	150,0 ±10,0 <sub>1</sub>	125,0 ±13,0 <sup>1</sup> <sub>3</sub>	112,0 ±11,0 <sub>1</sub>	79,0 ±7,0 <sup>1,3</sup>	50,0 ±14,0 <sup>1,4</sup>
Больные с тяжелым сепсисом	10	15,5 ±0,5 <sup>1</sup>	13,5 ±0,2 <sup>1,3</sup>	11,5 ±0,1 <sup>1,4</sup>	9,5 ±0,2 <sup>1,4</sup>	6,3 ±0,3 <sup>1,3</sup>	180,0 ±10,0 <sub>1</sub>	142,0 ±10,0 <sup>3</sup>	120,0 ±13,0 <sub>1</sub>	90,0 ±10,0 <sup>1</sup> <sub>4</sub>	65,0 ±10,0 <sup>1,3</sup>
Здоровые доноры	15	1,3 ±0,5	-	-	-	-	10,0 ±3,0	-	-	-	-

\* – дни пребывания в стационаре.

<sup>1</sup>-p<0,01, <sup>2</sup>- p<0,05 – относительно показателей здоровых доноров.

<sup>3</sup>- p<0,01, <sup>4</sup>- p<0,05 – относительно показателей предыдущего периода измерения (сутки).

При сравнении показателей активности радикалформирующей способности нейтрофилов больных разных подгрупп обнаружено, что продукция супероксиданион радикала и оксида азота во второй подгруппе (тяжелый сепсис) достоверно выше ( $p < 0,01$ ). К седьмому – четырнадцатому дню показатели активности свободно-радикальных процессов у больных с сепсисом и тяжелым сепсисом снижаются только на 47 % и 39 %, соответственно. К тридцатому дню пребывания в стационаре нормализации измеряемых параметров не происходит: они остаются повышенными на 25 % и 32 % соответственно.

Подобный всплеск радикалообразования является защитной реакцией организма на микробную агрессию, однако, на фоне сниженных параметров антиоксидантной системы, выявленных при генерализованной инфекции [6,7], неизбежно приведет к радикал-зависимому повреждению собственных органов и тканей [11].

Повышенное образование оксида азота и супероксиданион радикала приводит к образованию еще более токсичного соединения – пероксинитрита [4,6]. Таким образом, параметры радикалообразования при генерализованной инфекции являются важными в прогностическом плане и являются патогенетическим обоснованием эффективности длительного применения антиоксидантов в терапии критических состояний, что ведет к сглаживанию иммунодепрессивного действия токсических метаболитов на клетки и позволяет достичь более выраженной коррекции их функциональной активности.

Выявленный подъем активности процессов генерации радикалов у больных с генерализованной инфекцией должен был привести к быстрому и эффективному уничтожению патогенных бактерий. Однако при изучении фагоцитарных показателей при генерализованной стафилококковой инфекции обнаружено, что эффективность фагоцитоза значительно снижена (табл. 2). Как видно из приведенных данных, страдает как поглотительная активность нейтрофилов, так и переваривающая их способность.

Обращают на себя внимание результаты оценки фагоцитарной активности нейтрофилов пациентов с тяжелым сепсисом в первые сутки – ФЧ –  $19,0 \pm 1,0$  % при показателях доноров  $38,0 \pm 1,5$  %, примерно каждый третий поглощенный микроб не подвергается внутриклеточному киллингу и продолжает персистировать в нейтрофилах (табл. 2).

Несмотря на выявленную положительную динамику фагоцитарных параметров (% фагоцитирующих клеток и % бактерий, выживших после фагоцитоза), к 30 суткам нормализации измеряемых показателей не происходит ( $p < 0,05$ ) (табл. 2).

Таблица 2

Фагоцитарные показатели нейтрофилов периферической крови больных с генерализованной стафилококовой инфекцией ( $X \pm m$ )

Нейтрофилы периферической крови	Число пациен-тов	% фагоцитирующих клеток					% выживших бактерий после фагоцитоза				
		1*	2	7	14	30	1*	2	7	14	30
Больные с ССВО	25	27,5 $\pm 1,5$ <sub>1</sub>	27,0 $\pm 0,2$ <sub>1</sub>	28,0 $\pm 0,5$ <sup>1,4</sup>	29,5 $\pm 2,0$ <sub>1</sub>	30,0 $\pm 1,0$ <sub>1</sub>	20,0 $\pm 1,5$ <sub>1</sub>	16,0 $\pm 1,5$ <sup>1,4</sup>	15,0 $\pm 1,0$ <sup>1</sup>	12,5 $\pm 1,5$ <sub>1</sub>	10,0 $\pm 1,0$ <sub>1</sub>
Больные тяжелым сепсисом	10	19,0 $\pm 1,0$ <sub>1</sub>	21,5 $\pm 1,3$ <sub>1</sub>	24,0 $\pm 1,5$ <sup>1</sup>	27,5 $\pm 2,0$ <sub>1</sub>	29,0 $\pm 1,0$ <sub>1</sub>	27,0 $\pm 1,0$ <sub>1</sub>	22,0 $\pm 1,0$ <sup>1,3</sup>	17,0 $\pm 1,5$ <sup>1,3</sup>	14,5 $\pm 1,0$ <sub>1</sub>	12,0 $\pm 1,5$ <sub>1</sub>
Доноры	15	38,0 $\pm 1,5$	-	-	-	-	5,0 $\pm 0,5$	-	-	-	-

\* – дни пребывания в стационаре.

<sup>1-</sup>  $p < 0,01$ , <sup>2-</sup>  $p < 0,05$  – относительно показателей здоровых доноров.

<sup>3-</sup>  $p < 0,01$ , <sup>4-</sup>  $p < 0,05$  – относительно показателей предыдущего периода измерения (сутки).

Полученные результаты позволяют предположить, что снижена эффективность именно внутриклеточных бактерицидных механизмов. Известно, что процесс внутриклеточного уничтожения бактерий определяется кооперативным действием как лизосомальных ферментов, так и внутриклеточно генерируемых радикалов.

Мы полагаем, что оптимальным является подход к оценке функционального состояния макроорганизма не с точки зрения «недостаточности» каких-либо органических функций – более грубых и часто необратимых нарушений, а с точки зрения начальных проявлений отклонений от нормы, когда на клеточном уровне первоначально защитные функции радикалов превращаются в токсические для собственных органов и тканей. Такая стратегия позволит быстрее уловить перемены в состоянии больного, определить способность организма больного к самостоятельному поддержанию гомеостаза и оперативней вносить необходимые коррективы в терапию. Совокупность представленных данных указывает и на то, что, несмотря на бактерицидные свойства радикалов, на разных стадиях стафилококкового инфекционного процесса, микробицидный потенциал клеток видового иммунитета ограничен.

### Список литературы

1. Маеда Х., Акаике Т. Оксид азота и кислородные радикалы при инфекции, воспалении и раке // Биохимия. – 1998. – Т. 63. – Вып. 7. – С. 1007-1019.
2. Мухин Н. А., Козловская Л. А., Белокриницкая О. А., Таранова М. В. Успешное лечение сепсиса с полиорганным поражением // Врач. – 2000. – № 10. – С. 7-14.
3. Нагоева М. Х. Состояние показателей фибронектина у больных бактериальной ангиной // Клиническая лабораторная диагностика. – 2010. – № 9. – С. 64а-64б.
4. Нагоева М. Х. Оценка состояния провосполительных и противовоспалительных цитокинов у больных бактериальной ангиной // Вестник медицинских технологий. – 2009. – Е16. – № 1. – С. 85-88.
5. Проскуряков С. Я., Бикетов С. И., Иванников А. И., Скворцов В. Г. Оксид азота в механизмах внутриклеточных инфекций // Иммунология. – 2000. – № 4. – С. 9-20.
6. Северин Е. С. Биохимические основы патологических процессов. – М.: Медицина, 2000. – С. 267-290.
7. Снайдер С. Х., Бредт Д. С. Биологическая роль оксида азота // В мире науки. – 1992. – № 7. – С. 16-24.
8. Хараева З. Ф. Свободно-радикальные процессы в живых системах в норме и при инфекционных заболеваниях стафилококковой этиологии // Нальчик. – 2012. – 167 с.



9. Asharet A., Powers L., Butler N. et al. Anti-inflammatory response in associated mortality and severity of infection in sepsis. *Am. J. Physiology. Lung Cell Mol. Physiological.* 2005. – Vol. 288, № 4. – P. 633640.
10. Nielsen S. L., Black F., Storgaard M., Obel N. Evaluation of a method for measurement of intracellular killing of *Staphylococcus aureus* in human neutrophil granulocytes // *J. Biochem.* – 1995. – Vol. 118(2). – P.271-277.
11. Power C., Wang J-H., Sookhai S., Wu Q-D., Radmond H-P. Proinflammatory effects of bacterial lipoprotein on human neutrophil activation status, function and cytotoxic potential in vitro. *Shok.* 2001 Jun; 15 (6): 461-6.
12. Schlivert P. M. Use of intravenous immunoglobulin in treatment of staphylococcal and streptococcal toxic shock syndromes and related illnesses // *J. Allergy Clin. Immun.* – 2001. – Vol.108(4). – P. S107-S110.
13. Van den Akker E., Lutgenk J. T., Lafleur M. V. M., et al. The formation of one-G deletions as a consequence of single-oxygen-induced DNA damage // *Uutat Ret.* – 2004. – V.309. – P.45-52.