

УДК 57.083.3:616.2-002.2

**ФАГОЦИТАРНА АКТИВНІСТЬ  
НЕЙТРОФІЛІВ ПЕРИФЕРІЙНОЇ КРОВІ ТА  
МАКРОФАГІВ БРОНХОАЛЬВЕОЛЯРНОГО  
ЛАВАЖУ ПРИ ПНЕВМОНІЙ РІЗНОЇ  
ЕТИОЛОГІЇ В ЕКСПЕРИМЕНТІ**

**Коляда Т.І., Бруснік С.В., Михайличенко М.С.,  
Нестеренко А.М., Коляда О.М.**

**ДУ «Інститут мікробіології та імунології ім. І.І.  
Мечникова АМНУ»  
м. Харків**

Незважаючи на поширення та доступність сучасних високоефективних протимікробних препаратів, позалікарняна пневмонія, як і раніше, є актуальною проблемою та посідає провідне місце серед захворювань на інфекційні хвороби [1].

Згідно існуючим на сьогоднішній день даним статистичних досліджень, присвячених вивченню збудників пневмонії, *Staphylococcus aureus* займає четверте місце [1, 2].

При вивченні імунологічних особливостей перебігу стафілококової пневмонії на модельних мишах із застосуванням протеомічних методів було показано, що імунна реакція на *S. aureus* має виразні специфічні особливості. Характерними рисами реакції імунної системи, що розгортається у відповідь на цей збудник є активна міграція поліморфноядерних нейтрофілів у легені та дихальні шляхи та різке підвищення концентрації прозапальних білків та білків коагуляції у бронхоальвеолярному лаважі [3].

Досить цікавим також є дослідження імунологічної реакції на кандидозну пневмонію, а особливо при умові асоціації *Candida albicans* із іншими збудниками, що відбувається завдяки її здатності до коменсальних та симбіотичних відносин із бактеріальними патогенами. Ключова роль в протикандидозному захисті відводиться фагоцитозу. Слід підкреслити, що літературні дані стосовно відносного вкладу нейтрофілів та макрофагів досить суперечливі [4, 5].

В останній час в літературі вказується на вірогідність розвитку захворювання при нормальній нейтрофільній функції [6]. Також той факт, що при нейтрофільній дисфункції зберігається здатність "хазяїна" контролювати перебіг кандидозної інфекції вказує на одночасну дію альтернативних механізмів фагоцитозу, наприклад, за рахунок моноцитів та макрофагів [7].

Клітинний імунітет, а саме активація макрофагів Т-клітинами, вважається важливим компонентом захисту при системному кандидозі. Однак існує низка даних, що спростовує уявлення про важливість макрофагального фагоцитозу у процесі елімінації *Candida albicans*. На культурах альвеолярних макрофагів кролика та нейтрофілів морської свинки було показано, що мононукле-

арні фагоцитуючі клітини не тільки не були здатні знищити патоген *in vitro*, але й піддавалися апоптозу за рахунок впливу *C. albicans*. Окрім того, при дослідженні фагоцитозу *C. albicans* за рахунок макрофагів було показано на лініях мишей, котрі мають порушення деяких генів цитокінів, що рівень фагоцитарної активності та кілінг патогенів не корелюють [8]. Окрім того, активація макрофагів не завжди посилює їх здатність до переварювання патогену. В той же час в цілому слід вказати, що здатність клітин до фагоцитозу *Candida albicans* притаманна більшості савців, макрофагальний фагоцитоз спостерігається практично на усіх анатомічних сайтах [9].

Як правило, для нормального фагоцитозу *C. albicans* необхідна опсонізація антитілами, що є специфічними до патогену, та присутність компонентів комплементу. Також для ефективного фагоцитозу необхідна наявність кальцію та компонентів не тільки класичного, але й альтернативного шляхів активації комплементу.

В легенях при кандидозі також спостерігається фагоцитоз, що не потребує участі опсонінів. Така форма фагоцитозу здійснюється за рахунок рецепторів маннози та глюкану [3] й спостерігається для альвеолярних макрофагів як у мишей, так і у людини.

Отже метою даного дослідження було вивчити характер фагоцитарної активності нейтрофілів периферійної крові та макрофагів бронхоальвеолярного лаважу в залежності від типу інфекційного агента та характеру інфекції.

### **Матеріали та методи**

Модельним об'єктом основного експерименту були обрані 60 самиць мишей лінії Balb/c приблизною вагою 21 - 22 грами, отриманих із виварію ДУ "ІМІ ім. І.І. Мечникова АМНУ". В експерименті були використані наступні штами мікроорганізмів: *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Candida albicans* (ATCC 885-653), що були отримані із музею мікроорганізмів ДУ "ІМІ ім. І.І. Мечникова АМНУ".

Згідно задачам експерименту було відтворено модель інфекційної пневмонії на мишах [10, 11].

При підборі дози інфікування мишей було розподілено на три групи, котрих інфікували інтраназально по 0,1 мл *S. aureus* в дозах  $10^7$ ,  $10^8$ ,  $10^9$  КУО. На цьому дубу після інфікування мишей усіх трьох груп було виведено із експерименту за для підтвердження наявності інфекційного запалення легень мікробіологічними та гістологічними методами [12, 14]. На основі отриманих результатів мікробіологічних та гістологічних досліджень була підібрана доза *Staphylococcus aureus* -  $10^8$  КУО, що викликала запальний процес у легенях. Необхідну для виникнення запального процесу легень дозу *C. albicans* -  $10^8$  КУО підібрано в аналогічний спосіб.

Для вивчення спільного впливу *S. aureus* та *C. albicans* на імунологічні показники мишам вводили інтраназально по 0,1 мл суспензії обох збудників у наступних дозах: *S. aureus* -  $10^8$  КУО та *C. albicans* -  $10^9$  КУО.

В ході відтворення моделі інфекційного запалення легень лабораторних мишей було розподілено на такі групи (по 8 тварин у кожній):

**I група** - інфіковані культурою *S. aureus* у дозі  $1 \times 10^8$  КУО, що були виведені із експерименту на третю добу. **II група** - інфіковані *S. aureus* у дозі  $1 \times 10^8$  КУО, виведені із експерименту на шосту добу. **III груп** - інфіковані культурою *C. albicans* у дозі  $1 \times 10^8$  КУО, виведені із експерименту на третю добу. **IV група** - інфіковані культурою *C. albicans* у дозі  $1 \times 10^8$  КУО, виведені із експерименту на шосту добу. **V група** - тварини, інфіковані суспензією, що містила культури *S. aureus* ( $10^8$  КУО) та *C. albicans* ( $10^9$  КУО), виведені із експерименту на третю добу. **VI група** - тварини, інфіковані суспензією, *S. aureus* ( $10^8$  КУО) та *C. albicans* ( $10^9$  КУО), виведені із експерименту на шосту добу. **VII групу** склали інтактні тварини, виведені із експерименту на третю добу. **VIII група** - інтактні тварини, які виведені із експерименту на шосту добу. Всі миші були інфіковані інтраназально. Виведення тварин із експерименту здійснювалось шляхом декапітації під ефірним наркозом.

Активність сегментоядерних нейтрофілів периферичної крові досліджували за здатністю цих клітин до поглинання часток латексу із розрахунком фагоцитарного індексу (ФІ) та фагоцитарного числа (ФЧ) [15 - 17]. В такий же спосіб оцінювали фагоцитарну активність макрофагів у бронхоальвеолярному лаважі. Зміни зазначених

показників досліджувались в динаміці інфекційного запального процесу, а саме на третю та шосту добу його перебігу.

Статистичну обробку отриманих результатів проводили за допомогою ліцензійних програмних продуктів, які входять в пакет Microsoft Office Professional 2003®, на персональному комп'ютері у програмі Excel® із використанням критерію Ст'юдента. За рівень вірогідності приймалися значення показника між групами (p), які дорівнювали або були меншими за 0,05.

### Результати та їх обговорення

У тварин всіх дослідних груп спостерігалися достовірні зміни фагоцитарного індексу (ФІ) та числа (ФЧ) нейтрофілів периферійної крові як на третю так і на шосту добу перебігу запального процесу у порівнянні із неінфікованими тваринами.

Так на третю добу у мишей із стафілококовим запальним процесом у легенях (I група) ФІ склав ( $85 \pm 5,01$ ) % проти ( $66 \pm 3,1$ ) % у VII групі, ( $p < 0,05$ ). На шосту ж добу (II група) - ( $93 \pm 4,7$ ) % у порівнянні з VIII групою ( $68 \pm 3,4$ ) %, ( $p < 0,05$ ), (рис. 1). В динаміці достовірних змін цього показника не зареєстровано. Щодо фагоцитарного числа нейтрофілів то, воно було достовірно підвищеним у I та II другій групах по відношенню до відповідних контролів і також без різниці в динаміці - ( $7,3 \pm 0,5$ ) на третю добу проти ( $5,2 \pm 0,2$ ) у контролі, (рис. 1); ( $9 \pm 0,5$ ) на шосту добу проти ( $5,4 \pm 0,3$ ) у відповідному контролі, (рис. 1).

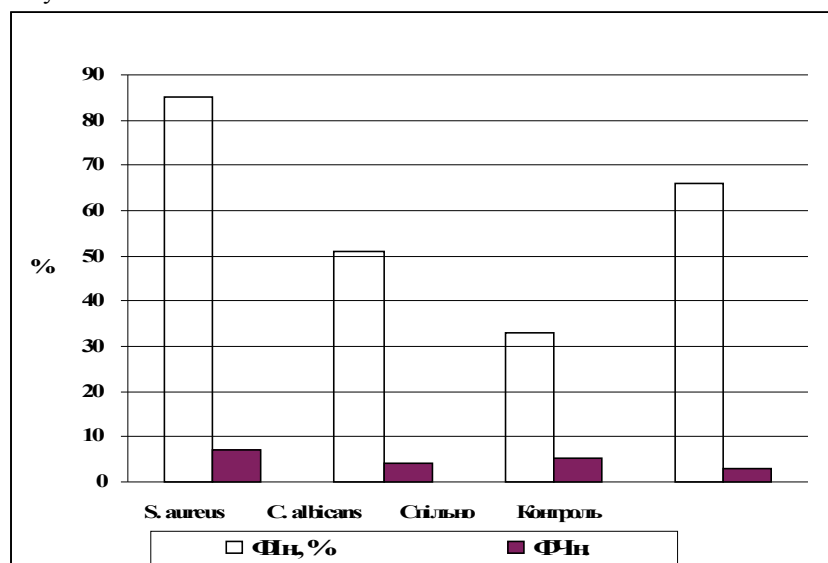


Рис. 1 - Фагоцитарна активність нейтрофілів на третю добу перебігу інфекційного процесу.

У інфікованих *C. albicans* тварин при спостереженні на третю й на шосту добу зареєстровано достовірне зниження як фагоцитарного індексу так і фагоцитарного числа нейтрофілів -

на третю добу: ФІ склав ( $51 \pm 4,2$ ) % проти ( $66 \pm 3,1$ ) %, ( $p < 0,05$ ); ФЧ - ( $4 \pm 0,4$ ) проти ( $5,2 \pm 0,2$ ); на шосту добу: ФІ - ( $48 \pm 4,0$ ) проти ( $68 \pm 3,4$ ), ( $p < 0,05$ ); ФЧ склало ( $3,6 \pm 0,3$ ) проти ( $5,4 \pm 0,3$ ), (рис. 1, 2). Достовірних відмінностей у фагоцитарному

індекси та числі в динаміці кандидозного процесу не спостерігалось.

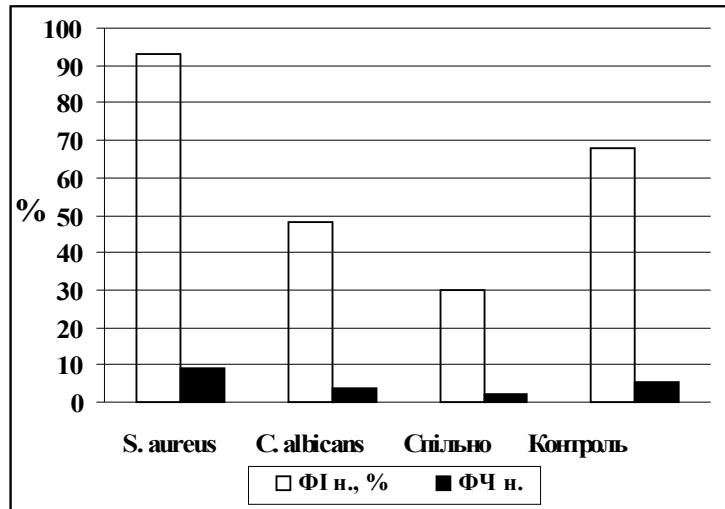


Рис. 2 - Фагоцитарна активність нейтрофілів на шосту добу перебігу інфекційного процесу.

У результаті розвитку запального процесу, викликаного введенням обох збудників, на третю добу (V група) перебігу фагоцитарний індекс був зниженим в два рази і склав  $(33 \pm 5,2)$  % проти  $(66 \pm 3,1)$  % в контролі (VII група),  $(p < 0,05)$ , що відмічено і у зміні фагоцитарного числа -  $(2,1 \pm 0,4)$  проти  $(5,2 \pm 0,2)$ . Зниженими ці показники залишались і на шосту добу перебігу запального процесу (VI група) - ФІ:  $(30 \pm 4,6)$  проти  $(68 \pm 3,4)$  контролю (VIII група),  $(p < 0,05)$ ; ФЧ:  $(2,4 \pm 0,5)$  проти  $(5,4 \pm 0,3)$ .

Таким чином найбільше підвищення фагоцитарного числа та індексу нейтрофілів периферійної крові спостерігалось у мишей, що були інфіковані *S. aureus* як на третю, так і на шосту добу інфекційного процесу.

Суттєве зниження цих показників зареєстровано у групах, котрі були інфіковані обома

збудниками, що зберігалось і на шосту добу процесу.

При дослідженні показників фагоцитарної активності макрофагів в бронхо-альвеолярному лаважі було встановлено достовірне підвищення фагоцитарного індексу по відношенню до контролів у групах, що були інфіковані *S. aureus*: у I групі -  $(83 \pm 4,2)$  % проти  $(68 \pm 2,4)$  %,  $(p < 0,05)$ , та II -  $(90 \pm 4,4)$  % проти  $(70 \pm 4,9)$  %,  $(p < 0,05)$ ; на третю добу перебігу кандидозного запалення легень (III група) відмічено підвищення цього показника -  $(80 \pm 4,0)$  % проти  $(68 \pm 4,2)$  %,  $(p < 0,05)$ ; в IV ж групі (шоста доба кандидозного процесу) спостерігається достовірне зниження ФІ макрофагів -  $(55 \pm 3,8)$  % проти  $(70 \pm 2,9)$  %,  $(p < 0,05)$ ; при умові мікстінфекції - у V групі  $(37 \pm 5,0)$  % проти  $(68 \pm 4,2)$  %,  $(p < 0,05)$  та VI  $(38 \pm 4,2)$  % проти  $(70 \pm 2,9)$  %,  $(p < 0,05)$ .

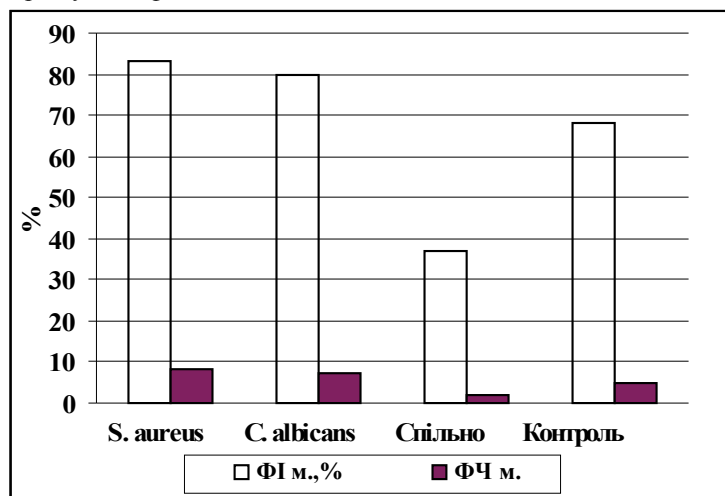


Рис. 3 - Фагоцитарна активність бронхоальвеолярних макрофагів на третю добу перебігу інфекційного процесу.

Подібний стан показників розповсюджувався і на фагоцитарне число альвеолярних

макрофагів, воно було підвищеним при стафілококовому запальному процесі легень як на третю, так і на шосту добу його перебігу. У I групі цей

показник склав  $(8,4 \pm 0,2)$  проти VII групи у контролі  $(5,0 \pm 0,3)$ , у II -  $(10 \pm 0,3)$  проти  $(5,6 \pm 0,4)$  у VIII групі. При кандидозному запаленні зареєстровано підвищення фагоцитарного числа альвеолярних макрофагів на третю добу - у III

групі  $(7,3 \pm 0,3)$  проти  $(5,0 \pm 0,3)$ , у IV ж групі зниження -  $(3,7 \pm 0,4)$  проти  $(5,6 \pm 0,4)$ . Ще значніше зниження цього показника відмічено у групах із мікстинфекцією: у V групі  $(2,0 \pm 0,5)$  проти  $(5,0 \pm 0,3)$ , та у VI групі  $(3,1 \pm 0,5)$  проти  $(5,6 \pm 0,4)$ .

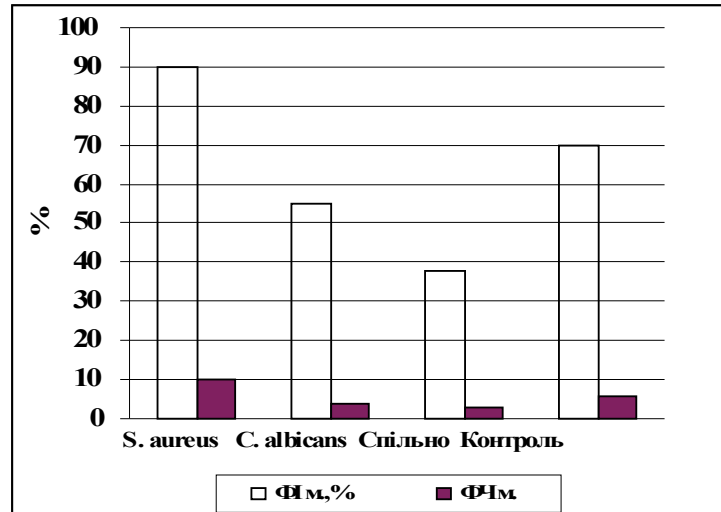


Рис. 4 - Фагоцитарна активність бронхоальвеолярних макрофагів на шосту добу перебігу інфекційного процесу.

Таким чином ми можемо спостерігати суттєве підвищення значень фагоцитарного індексу та фагоцитарного числа альвеолярних макрофагів на третю та шосту добу перебігу стафілококового запального процесу легень, що забезпечує елімінацію збудника на адекватному рівні неспецифічної відповіді. При кандидозному запаленні відмічено підвищення цих показників на третю добу перебігу запалення, що змінюється в динаміці процесу. Суттєвого зниження фагоцитарний індекс та фагоцитарне число зазнали у мишей із запаленням, обумовленим обома збудниками, що свідчить про пригнічення місцевої неспецифічної протиінфекційної відповіді.

#### Висновки

1. За умов експериментально відтвореного стафілококового запального процесу у легенях мишей на третю добу його перебігу фагоцитарна активність сегментоядерних нейтрофілів периферійної крові та макрофагів лаважу була суттєво підвищеною, що спостерігалось і в динаміці процесу. Активація фагоцитів крові та бронхоальвеолярного лаважу призвела до успішної елімінації інфекційного збудника.
2. При кандидозному запаленні як на третю, так і на шосту добу було відмічено зниження фагоцитарної активності нейтрофілів крові та макрофагів лаважу по відношенню до контролю, що відображалось погіршенням стану дослідних тварин.
3. Найбільш значного та стійкого пригнічення вказані показники зазнали у тварин, чий запальний легеневий процес був викликаний мікстинфекцією, котра пригнічує місцеву неспеци-

фічну протиінфекційну відповідь, що, можливо, і обумовило 50 % загибель піддослідних тварин цієї групи.

УДК 57.083.3:616.2-002.2

#### ФАГОЦИТАРНА АКТИВНІСТЬ НЕЙТРОФІЛІВ ПЕРИФЕРІЙНОЇ КРОВІ ТА МАКРОФАГІВ БРОНХОАЛЬВЕОЛЯРНОГО ЛАВАЖУ ПРИ ПНЕВМОНІЙ РІЗНОЇ ЕТІОЛОГІЇ В ЕКСПЕРИМЕНТІ

Коляда Т.І., Бруснік С.В., Михайличенко М.С., Нестеренко А.М., Коляда О.М.

Позалікарняна пневмонія є достатньо актуальною проблемою та посідає провідне місце за смертністю від інфекційних захворювань. Імунна реакція, зокрема неспецифічна резистентність, має виразні специфічні особливості в залежності від характеру збудника запального процесу легень. Стафілококовий запальний процес у легенях супроводжується підвищенням фагоцитарної активності нейтрофілів крові та макрофагів бронхоальвеолярного лаважу, кандидозний же, навпаки, зниженням. Найбільш значного та стійкого зниження ці показники зазнали у тварин, чий легеневий запальний процес був викликаний мікстинфекцією.

**Ключові слова:** інфекційна пневмонія, Staphylococcus aureus, Candida albicans, фагоцитарна активність нейтрофілів, фагоцитарна активність макрофагів. УДК 57.083.3:616.2-002.2

УДК 57.083.3:616.2-002.2

#### ФАГОЦИТАРНАЯ АКТИВНОСТЬ НЕЙТРОФИЛОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ И

## МАКРОФАГОВ БРОНХОАЛЬВЕОЛЯРНОГО ЛАВАЖА ПРИ ПНЕВМОНИИ РАЗЛИЧНОЙ ЭТИОЛОГИИ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

Коляда Т.И., Брусник С.В., Михайличенко  
М.С., Нестеренко А.М., Коляда О.Н.

Внебольничная пневмония - достаточно актуальная проблема и занимает ведущее место среди смертности от инфекционных болезней. Иммунная реакция, в частности неспецифическая резистентность, имеет выразительные специфические особенности в зависимости от характера возбудителя воспалительного легочного процесса. Стафилококковый воспалительный процесс в легких сопровождается повышением показателей фагоцитарной активности нейтрофилов крови и макрофагов бронхоальвеолярного лаважа, кандидозный же, наоборот, снижением. Наиболее сильного и стойкого снижения претерпели данные показатели у животных, чей воспалительный процесс был вызван микстинфекцией.

**Ключевые слова:** инфекционная пневмония, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, фагоцитарная активность нейтрофилов, фагоцитарная активность макрофагов.

UDC 57.083.3:616.2-002.2

## PHAGOCYtic ACTIVITY OF PERIPHERAL BLOOD NEUTROPHILS AND BRONCHOALVEOLAR LAVAGE MACROPHAGES IN EXPERIMENTAL PNEUMONIA OF DIFFERENT ETIOLOGY

Kolyada T.I., Brusnik S.V., Mikhailichenko M.S.,  
Nesterenko A.M., Kolyada O.M.

Nosocomial pneumonia is an important problem and is one of the leading causes of mortality from infectious diseases. The immune response in course of pneumonia, especially the non specific resistance features, is pathogen-specific and differs depending on the type of the causative agent of pathologic processes in the lung. The staphylococcal inflammatory process in the lung is accompanied by an increase in the phagocytic activity of blood neutrophils and bronchoalveolar lavage macrophages. On the contrary, candidal inflammation is characterized by the decrease in these parameters. The most pronounced and stable decrease in phagocytic activity was observed in animals with inflammation caused by mixed infection.

**Key words:** infectious pneumonia, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, neutrophil phagocytic activity, macrophage phagocytic activity.

### Перелік посилань

1. Rotstein, C. Clinical practice guidelines for hospital-acquired pneumonia and ventilator-associated pneumonia in adults [Text] / Rotstein C., Evans G., Born A. Grossman R., Light R. B., Magder S., McTaggart B., Weiss K., Zhanel G. G. //

Can. J. Infect. Dis. Med. Microbiol. - 2008. - V. 19. - №1. - p. 19 – 53. ISSN: 1712-9532.

2. Holm, A. Aetiology and prediction of pneumonia in lower respiratory tract infection in primary care [Text] / Holm A., Nexoe J., Bistrup L. A., Pedersen S. S., Obel N., Nielsen L. P., Pedersen C. // British Journal of General Practice. - 2007. - №6. - p. 547 – 554. ISSN: 0960-1643.

3. Fraser, J. Superantigens: powerful modifiers of the immune system [Text] / Arcus V., Kong P., Baker E., Kong P., Baker E., Proft T. // Mol. Med. Today. - 2000. -V. 6. -p. 125 – 132. ISSN: 1357-4310.

4. Kubota, Y. Role of alveolar macrophages in *Candida*-induced acute lung injury [Text] / Kubota Y., Iwasaki Y., Harada H., Yokomura I., Ueda M., Hashimoto S., Nakagawa M. // Clinical and diagnostic laboratory immunology. – 2001. - Vol. 8. - №. 6. - p. 1258 – 1262. ISSN: 1071-412X.

5. Aratani, Y. Role of myeloperoxidase in the host defense against fungal infection [Text] / Aratani Y. // Nippon Ishinkin Gakkai Zasshi. – 2006. – V.47. - № 3. – p. 195 - 199. ISSN: 0916-4804.

6. Romani, L. Interleukin-12 but not interferon-gamma production correlates with induction of T helper type-1 phenotype in murine candidiasis [Text] / Romani L., Mencacci A., Tonnetti L., Spaccapelo R., Cenci E., Wolf S., Puccetti P., Bistoni F. // Eur. J. Immunol. - 1994. - V. 24. - № 4. - p. 909 - 915. ISSN: 0014-2980.

7. Kobayashi, M. Effect of a combination therapy between IL-12 and soluble IL-4 receptor (sIL-4R) on *Candida albicans* and herpes simplex virus type I infections in thermally injured mice [Text] / Kobayashi M., Takahashi H., Herndon D. N., Pollard R. B., Suzuki F. // Can. J. Microbiol. - 2002. -V. 48. - № 10. -p.886 - 894. ISSN: 0008-4166.

8. Genestier, A.-L. *Staphylococcus aureus* Panton-Valentine leukocidin directly targets mitochondria and induces Bax-independent apoptosis of human neutrophils [Text] / Genestier A.-L., Michallet M.-C., Prévost G., Bellot G., Chalabreysse L., Peyrol S., Thivolet F., Etienne J., Lina G., Vallette F. M., Vandenesch F., Genestier L. // The Journal of Clinical Investigation. - 2005. – V. 115. - №11. - p.113 - 120. ISSN: 0021-9738.

9. Fraser, J. Superantigens: powerful modifiers of the immune system [Text] / Arcus V., Kong P., Baker E., Kong P., Baker E., Proft T. // Mol. Med. Today. - 2000. -V. 6. -p. 125 – 132. ISSN: 1357-4310

10. Ventura, C. L. Host airway proteins interact with *Staphylococcus aureus* during early pneumonia [Text] / Ventura C. L., Higdon R. R., Kolker E., Skerrett S. J., Rubens C. E. // Infection and immunity. – 2008.- V. 76. - № 3. - p. 888 – 898. ISSN: 0019-9567.

11. Londono, P. Evaluation of the intranasal challenge route in mice as a mucosal model for *Candida albicans* infection [Text] / Londono P., Gao X.

M., Bove F., McPheat W. L., Booth G., Dougan G. // *Microbiology*. -1998. – V. 144. - № 6. -р. 2291 - 2298.

12. Савцова, З.Д. Сообщение 9. Морфофункциональные показатели некоторых иммунокомпетентных органов мышей [Текст] / Савцова З.Д., Ковбасюк С.А., Юдина О.Ю // *Радиобиология*. - 1991. - Т. 31. - № 5. - с. 679 - 686, ISSN 0859-8031.

13. Основные методы лабораторных исследований в клинической бактериологии [Текст] // Руководство ВООЗ. – Женева, 1994. – 132 с.

14. Герхардт, Ф. Методы общей бактериологии: Пер. с англ. В 3-х т. [Текст] // М.: Мир, 1984. – 472 с.

15. Новиков, Д.К. Оценка иммунного статуса [Текст] / Новиков Д.К., Новикова В.И. // Москва-Витебск. – 1996. – С. 163 - 180.

16. Фрейдлин, И.С. Иммунная система и ее дефекты [Текст] // Руководство для врачей. - СПб. - 1998. – 113 с.

17. Караулов, А.В. Клиническая иммунология [Текст] // Медицинское информационное агентство. - Москва, 1999. – 650 с.