

Зурочка А.В.\*, Городечный П.П.\*, Гриценко В.А.\*\*,  
Гриценко Я.В.\*\*, Дукардт В.В.\*, Кузьмина Е.Е.\*

\*ГОУ ВПО «Челябинская государственная медицинская академия» Росздрава, г. Челябинск

\*\*Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза УрО РАН, г. Оренбург

## УСТОЙЧИВОСТЬ К КАТИОННОМУ БЕЛКУ ЛЕЙКОЦИТОВ «ИНТЕРЦИДУ» КОПРОИЗОЛЯТОВ *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* И ИХ ВЛИЯНИЕ НА ХЕМОТАКСИС ПОЛИМОРФНОЯДЕРНЫХ ЛЕЙКОЦИТОВ У ЛИЦ СО СТАФИЛОКОКК-АССОЦИИРОВАННЫМ ДИСБАКТЕРИОЗОМ КИШЕЧНИКА

Фекальные штаммы *Staphylococcus aureus* от людей с дисбактериозом кишечника проявляют относительно низкий уровень устойчивости к катионному белку лейкоцитов «интерциду». В сравнении с тест-штаммом *S. aureus* «Cowan 209» копроизоляты *S. aureus* вызывают более выраженную активацию полиморфноядерных лейкоцитов пациентов, от которых они получены.

Ключевые слова: *Staphylococcus aureus*, дисбактериоз кишечника, катионные белки лейкоцитов, устойчивость, полиморфноядерные лейкоциты, хемотаксис

### Введение

Нарушения микробиоценоза кишечника с накоплением в нем золотистых стафилококков нередко вызывают у пациентов длительно текущий воспалительный процесс, который сопровождается тяжелым токсикозом, гипертермической реакцией, упорной рвотой, метеоризмом, учащенным жидким стулом, иногда с примесью слизи и крови, а также способствуют возникновению аллергических поражений кожи и органов дыхания [5]. Известно, что длительные дисбиотические сдвиги кишечного микробиоценоза приводят к изменениям иммунного статуса по типу вторичного иммунодефицита, следствием которого являются хронические воспалительные заболевания, обусловленные потенциально патогенными микроорганизмами, в том числе *Staphylococcus aureus* [4, 7]. В этой связи большой интерес вызывает вопрос о патогенетической причастности к развитию подобной патологии биологических свойств золотистых стафилококков и, прежде всего, устойчивости данных бактерий к гуморальным факторам антибактериальной защиты макроорганизма (в частности, катионным белкам лейкоцитов) [1]. Не меньшего внимания заслуживает вопрос, затрагивающий особенности взаимодействия золотистых стафилококков с профессиональными фагоцитами человека (в частности, полиморфноядерными лейкоцитами – ПМЯЛ), учитывая важную роль последних в обеспечении противoinфекционной защиты макроорганизма.

Цель настоящего исследования – анализ устойчивости к катионному белку лейкоцитов «интерциду» копроизолятов *S. aureus*, выделенных от людей со стафилококк-ассоциированным дисбактериозом кишечника, и хемотаксических параметров ПМЯЛ периферической крови пациентов, активированных аутоштаммами золотистых стафилококков.

### Материалы и методы

Под наблюдением в Клинике ГОУ ВПО «ЧелГМА» Росздрава находился 51 пациент с дисбактериозом кишечника, у которого золотистые стафилококки выделялись из 1 г фекалий в титрах  $10^4$  и более. У выделенных от этих больных 56 копроизолятов *S. aureus* определяли уровень устойчивости к «интерциду» (концентрация – 5,0 мг белка/мл) по описанному методу [2], рассчитывая индекс резистентности (ИндР, %) стафилококков по формуле:  $\text{ИндР} = \text{OD}_0 / \text{OD}_k * 100$ , где  $\text{OD}_0$  и  $\text{OD}_k$  – оптические плотности опытной и контрольной проб. С помощью методики определения хемотаксиса клеток под агарозным гелем [8, 9] у всех пациентов изучена хемотаксическая реакция ПМЯЛ на собственные штаммы стафилококков и «музейный» тест-штамм «Cowan 209». ПМЯЛ выделяли из гепаринизированной периферической крови (15 ЕД гепарина сульфата на 1 мл крови) пациентов путем градиентного центрифугирования. Для регистрации направленности хемотаксического ответа рассчитывался индекс хемотаксиса – отношение величины миграции ПМЯЛ к хемоаттрактан-

ту к величине миграции от него. После изучения подвижности ПМЯЛ оценивалась активность неспецифических эстераз фагоцитов в зонах миграции методом одновременного азосочетания по Пирсу с определением активности эстераз (%) и суммарного цитохимического коэффициента (СЦК, усл.ед.). Оценку распределения ПМЯЛ в зонах миграции осуществляли по индексам активности эстераз и индекс СЦК, для чего высчитывали отношения величин активности ферментов и СЦК в зонах миграции к хемоаттрактанту к соответствующим величинам в оппозитных зонах. Статистическая обработка результатов проведена в программе «Statistica 6.0» с применением критериев Mann-Whitney и Wald-Wolfowitz и корреляционного анализа [3, 6].

### Результаты и обсуждение.

Исследование показало, что средний уровень резистентности к катионному белку лейкоцитов «интерциду» у стафилококков, выделенных от пациентов, составил  $36,4\% \pm 3,2\%$  (табл. 1).

Подобный уровень устойчивости копроизолятов *S. aureus* к «интерциду», сопоставимый с резистентностью музейного тест-штамма *S. aureus* «Cowan 209», характерен для коагулазоотрицательных стафилококков и значительно ниже показателей устойчивости золотистых стафилококков, выделенных из

гнойно-воспалительных очагов [2]. Следует отметить, что группа копроштаммов *S. aureus* отличалась высокой степенью гетерогенности по анализируемому параметру. Об этом, в частности, свидетельствовал широкий диапазон варьирования ИндР (от 10,0 до 118,8%), а также наличие изолятов золотистых стафилококков, проявлявших как очень низкую (<20%), так и очень высокую (>100%) устойчивость к «интерциду» – их доли соответственно составили  $10,7 \pm 4,1$  и  $3,6 \pm 2,5\%$  от всех исследованных фекальных штаммов *S. aureus*.

Полученные данные позволяют сделать заключение, что при стафилококк-ассоциированном кишечном дисбактериозе в кишечнике могут находиться различные по уровню устойчивости к «интерциду» *S. aureus*, причем некоторые из них способны проявлять «супер-резистентность» к данному эффектору иммунитета макроорганизма. Последнее обстоятельство косвенно свидетельствует о роли кишечника как потенциального источника возбудителей гнойно-воспалительных заболеваний стафилококковой этиологии.

Оценка хемотаксической и метаболической активности полиморфноядерных лейкоцитов нейтрофилов выявила иной по выраженности ответ фагоцитов на аутоштаммы золотистых стафилококков по сравнению с «музейным» тест-штаммом *S. aureus* «Cowan 209» (табл. 2).

Таблица 1. Показатели резистентности копроштаммов *Staphylococcus aureus* к катионному белку лейкоцитов «интерциду»

Штаммы бактерий	Параметры резистентности бактерий к "интерциду"			
	ИндР, % (M±m)	Диапазон ИндР, % (min-max)	Доля штаммов с ИндР<20% (%)	Доля штаммов с ИндР>100% (%)
Копроштаммы <i>S. aureus</i> (n=56)	$36,4 \pm 3,2$	10,0-118,8	$10,7 \pm 4,1$	$3,6 \pm 2,5$
<i>S. aureus</i> «Cowan 209»	$21,2 \pm 5,8$	12,5-38,2	–	–

Примечание: ИндР – индекс резистентности бактерий

Таблица 2. Хемотаксическая и метаболическая активность полиморфноядерных лейкоцитов у лиц со стафилококк-ассоциированным дисбактериозом кишечника

Показатели лейкоцитов	Хемоаттрактанты	
	Тест-штамм <i>S. aureus</i> «Cowan 209»	Аутоштаммы <i>S. aureus</i>
Индекс хемотаксиса (n=51)	$1,35 \pm 0,03$	$1,64 \pm 0,10^*$
Индекс активности эстераз (n=51)	$0,92 \pm 0,03$	$1,08 \pm 0,05^*$
Индекс СЦК (n=51)	$0,94 \pm 0,02$	$1,06 \pm 0,05^*$

Примечание: \* – отличие от показателей в опытах с *S. aureus* «Cowan 209»,  $p < 0,05$ .

В целом аутоштаммы *S. aureus* обладали более выраженным активирующим действием на полиморфноядерные лейкоциты пациентов, от которых были выделены, чем «музейный» штамм *S. aureus* «Cowan 209», который, как было показано выше, обладал и более низкой устойчивостью к «интерциду».

Для уточнения взаимосвязи между изученными параметрами («интерцид»-резистентность стафилококков и показатели хемотаксической активности лейкоцитов) был проведен корреляционный анализ, который выявил наличие достоверной положительной корреляционной связи средней силы ( $r=0,33$ ) между индексом активности эстераз лейкоцитов и уровнем устойчивости аутош-

таммов *S. aureus* к «интерциду». Это является косвенным подтверждением того, что указанная качественная характеристика стафилококков способна оказывать на состояние фагоцитирующих клеток модифицирующий эффект, проявляющийся в выраженной стимуляции направленной подвижности клеток и активации их лизосомального аппарата. Нельзя исключить, что повышенная реакция лейкоцитов на «интерцид»-резистентные штаммы служит эффективным механизмом сдерживания распространения стафилококков из кишечника во внутренние органы человека, предотвращая тем самым развитие инфекционно-воспалительного процесса в макроорганизме.

**Список использованной литературы:**

1. Бухарин О.В. Персистенция патогенных бактерий. М.: Медицина, 1999.
2. Гриценко В.А., Гриценко Я.В. Чувствительность и адаптация стафилококков к бактерицидному действию катионного белка лейкоцитов «интерцида». Вестник ОГУ, 2005, 5 (Приложение): 19-22.
3. Гублер Е.В., Генкин А.А. Применение непараметрических критериев статистики в медико-биологических исследованиях. Л. Медицина, 1973.
4. Дерябин Д.Г. Стафилококки: экология и патогенность. Екатеринбург: Уро РАН, 2000.
5. Красноголовец В.Н. Дисбактериоз кишечника. М.: Медицина, 1989.
6. Лакин Г.Ф. Биометрия, М.: Высш. шк., 1990.
7. Хаитов Р.М., Пинегин Б.В. Вторичные иммунодефициты: клиника, диагностика, лечение. Иммунология, 1999, 1: 14-17.
8. Эберт Л.Я., Чукичев А.В., Зурочка А.В., Марачев С.И., Новокрещенов Л.Б. Способ определения вида бактериальной инфекции. А.С. 1156644 (СССР), Офиц. бюлл. Открытия и изобретения, 1985, 19: 9.
9. Nelson R.D., Quie P.G., Simmons R.L. Chemotaxis under agarose: A new and simple method for measuring chemotaxis and spontaneous migration of human polymorphonuclear leucocytes and monocytes. J. Immunol., 1975, 115: 1050-1058.