

**ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
ВЫСШЕГО ПРОФЕССИОНАЛЬНОГО ОБРАЗОВАНИЯ
БАШКИРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

**Медико-профилактический факультет с отделением микробиологии
Кафедра фундаментальной и прикладной микробиологии**

Габдрахманова Азалия Ранисовна

**ИССЛЕДОВАНИЕ ИММУНОДУЛИРУЮЩИХ ЭФФЕКТОВ
ЛИПОПОЛИСАХАРИДА ИЗ КЛЕТОЧНОЙ СТЕНКИ *E. COLI*
В ЭКСПЕРИМЕНТЕ**

Руководитель:

д.б.н.

профессор, д.м.н.

О.А. Князева

А.Р. Мавзютов

Уфа – 2016

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	5
ГЛАВА I. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	7
1.1. Многоэтапность иммунной защиты.....	7
1.1.1 Врожденный иммунитет.....	8
1.1.2. Клеточные факторы врожденного иммунитета.....	10
1.1.3. Роль лейкоцитарных показателей в иммунитете.....	12
1.1.4 Адаптивный иммунитет.....	15
1.2. Липополисахариды.....	17
1.2.1 Структура молекул ЛПС	17
1.2.2. Иммунобиологические свойства ЛПС.....	19
1.2.3. Распознавание ЛПС как «чужого» в системе врожденного иммунитета.....	21
1.3. Иммуномодуляторы, их классификация.....	24
1.4. Строение и химический состав бактериальной клетки.....	30
1.5. Семейство Enterobacteriaceae	35
1.6. Род Escherichia.....	38
ГЛАВА II. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	42
2.1. Материалы исследования.....	42
2.2. Методы исследования.....	43
2.2.1. Биологические методы исследования.....	43
2.2.2. Экспериментальная часть in vivo	48
2.2.3. Иммунологические методы исследования	49
2.2.3.1.Определение концентрации IgG и комплексов C1q-IgG в сыворотке крови мышей.....	49
2.2.3.2.Исследование поглотительной способности фагоцитов периферической крови.....	51

2.2.3.3. Функциональная активность фагоцитов по показателям НСТ-теста.....	51
2.2.3.4. Подсчет лейкоцитарной формулы.....	52
ГЛАВА III. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ.....	54
3.1. Уровень IgG и иммунных комплексов C1q-IgG в сыворотке крови.....	54
3.2. Фагоцитарная активность нейтрофилов	58
3.3. Метаболическая активность нейтрофилов по показателям НСТ-теста	62
3.4. Количественный состав форменных элементов крови.....	67
ВЫВОДЫ.....	73
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	74
ПРИЛОЖЕНИЕ.....	83

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ИМ – иммуномодуляторы

ИФН - интерфероны

ЛПС – липополисахарид

ПАМП - патоген-ассоциированные молекулярные паттерны

ПРР - паттерн-распознающие рецепторы

ТХУ – трихлоруксусная кислота

ФНО – фактор некроза опухоли

ЦФ - циклофосфамид

ЭТ - эндотоксин

IL – интерлейкины

LPB – липополисахарид-связывающий белок (LPS-binding protein)

LRR – лейциновые повторы (leucine-rich repeats)

TIR-домен - Toll/IL-1-рецепторный домен

TLR – toll-подобные рецепторы (toll-like receptors)

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность исследования. Липополисахарид (ЛПС) - полифункциональный компонент наружной мембраны всех грамотрицательных бактерий, который отвечает за многие иммунологические и патогенетические особенности течения инфекционного процесса [Гурбанова С.Ф., 2007]. Широкий спектр биологических свойств ЛПС объясняет большое внимание клиницистов и экспериментаторов к данному макромолекулярному компоненту микробной клетки [Онопrienко Н.Н., 2008].

По литературным данным известно, что циркуляция ЛПС в норме в системном кровотоке является основным фактором повышения неспецифической резистентности организма к инфекциям [Рябиченко, Е.В. с соавт., 2004, 2005]. Однако при патологических состояниях высвобождение ЛПС сопровождается лихорадкой, септическими состояниями [Руднов В.А., 2003.], мультиорганными поражениями [Пак С.Г., 2004; Арутюнов Г.П. и др., 2003; Харланова Н.Г. и др., 2004], шоком и даже летальными исходами.

В основе биологических эффектов лежит ЛПС-ассоциированная эндотоксинемия. При этом бактериальные ЛПС благодаря их уникальному химическому строению могут взаимодействовать с «Toll»-подобными рецепторами типа 4 (TLR-4) и вызывать сверхсильный иммунный ответ. Данный процесс опосредуется активацией сразу нескольких патогенетически значимых механизмов, обусловленных экспрессией генов интерлейкина-1 (IL-1), интерлейкина-6 (IL-6), фактора некроза опухолей- α (TNF- α) и оксида азота (NO)[Fujihara M., 2003].

Установлено, что ЛПС грамотрицательных условно - патогенных бактерий родов *Escherichia*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Haemophilus*, *Bacteroides*, *Prevotella* и *Fusobacterium* являются биологически активными веществами, которые влияют на функциональную активность моноцитов и

лимфоцитов крови человека. Они стимулируют секреторную функцию моноцитов и Т-хелперов, усиливают функциональную активность фагоцитов, что приводит к увеличению продукции провоспалительных цитокинов, которые необходимы для инициации гуморального и клеточного иммунитета [Косенко Ю.В., 2006].

Таким образом, литературные данные указывают на важную роль бактериальных ЛПС или эндотоксинов (ЭТ) для нормального развития и функционирования иммунной системы организма. Однако, механизм их действия на иммунную систему мало изучен и учитывая, что ключевым звеном иммунных реакций при инфекциях, вызванными грамотрицательными бактериями, является TLR-опосредованная активация фагоцитоза **целью исследования** явилась: Оценка влияния липополисахарида из клеточной стенки *E.coli* на некоторые показатели клеточного и гуморального иммунитета у лабораторных мышей.

Задачи исследования:

1. Индуцировать иммунодефицит у лабораторных мышей путем введения им циклофосфана.
2. Определить фагоцитарную (фагоцитарное число, фагоцитарный индекс) и метаболическую активность нейтрофилов (по восстановлению нитросинего тетразолия) в крови мышей с моделированным иммунодефицитом после курса введения липополисахарида *E.coli*.
3. Установить влияние липополисахарида *E.coli* на количественный состав форменных элементов крови (лейкоцитов, эозинофилов, палочкоядерных и сегментоядерных нейтрофилов, моноцитов) и значение лейкоцитарного индекса.
4. Провести количественную оценку уровня иммуноглобулинов G и их комплексов с субкомпонентом первого фактора компонента комплемента - C1q в сыворотке крови мышей после применения курса терапии препаратом липополисахарида *E. coli*.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Многоэтапность иммунной защиты

Иммунная система – важная часть организма, которая поддерживает гомеостаз путём распознавания и удаления из организма генетически чужеродных вторжений, возникающих как эндогенным путем, так и проникающих из внешней среды. Эта функция осуществляется благодаря факторам неспецифического (врожденного) и специфического (адаптивного) иммунитета [Галактионов В.Г., 2005]. Между собой адаптивный иммунитет и врожденный тесно связаны, однако эти типы иммунитета сильно различаются (табл.1)

Таблица №1.

Основные свойства врожденного и адаптивного иммунитета
(Ярилин А.А., 2010)

Характеристика	Врожденный иммунитет	Адаптивный иммунитет
Условия формирования	Формируется в онтогенезе вне зависимости от запроса	Формируется в ответ на запрос (поступление чужеродных агентов)
Объект распознавания	Группы чужеродных молекул, связанных с патогенностью	Индивидуальные молекулы (антигены)
Эффекторные клетки	Миелоидные, частично лимфоидные клетки	Лимфоидные клетки
Тип реагирования популяции клеток	Популяция клеток реагирует как целое (не клонально)	Реакция на антиген клональная
Распознаваемые молекулы	Образы патогенности; стрессорные молекулы	Антигены
Распознающие рецепторы	Патогенраспознающие рецепторы	Антигенраспознающие рецепторы
Угроза ауторегрессии	Минимальная	Реальная
Наличие памяти	Отсутствует	Формируется иммунологическая память

Иммунная система выступает в роли защиты организма от инфекций в ряд этапов, при этом специфичность защитной функции при прохождении каждого этапа усиливается:

1. Поверхностные или физические барьеры – является одной из самых простых и первых защит. Благодаря ним организм человека защищен от разного рода инфекций: механических, химических и биологических.
2. Врождённая иммунная система - реализовывает промежуточную реакцию неспецифического характера на возбудителей, в случае того, если они вкрались через вышесказанные барьеры.
3. Приобретённая иммунная защита – вступает в свою деятельность, если возбудителями были успешно преодолены воздействия врожденных иммунных механизмов. Данный этап иммунной системы помогает выработать намного усиленный иммунный ответ. Кроме этого, формируется иммунологическая память, которая любой посторонний микроорганизм «запоминает» по уникальным для него антигенам [Л. А. Зильбер, 1958].

Оба типа иммунного ответа в макроорганизме образуют целостную систему, при этом для запуска адаптивного иммунитета необходимо развитие врожденного.

1.1.1 Врожденный иммунитет

Врождённую (видовую, генетическую, естественную) иммунную защиту называют неспецифичной, то есть её звенья распознают и реагируют на чужеродные тела независимо от их особенностей [Меджитов Р., Джаневей Ч., 2004]. Эта система не вырабатывается в процессе филогенеза и передается по наследству.

В процессе эволюции врожденный иммунитет у разных видов живых организмов проявляется разнообразно. Однако его общие принципы функционирования у многоклеточных на разных стадиях развития одинаковы. Для формирования неспецифического иммунного ответа необходимы следующие его составляющие:

1. распознавание с помощью специализированных на узнавании образов патогенности рецепторов посторонних агентов во внутренней среде организма;
2. элиминация опознанных чужеродных агентов из организма путем фагоцитоза и расщепления [Яриллин А.А., 2010].

Основной особенностью таких механизмов, обеспечивающих устойчивость к инфекционным агентам, является наличие в организме готовых эффекторов, которые способны без каких-либо подготовительных этапов обеспечить быструю деструкцию патогена. Они составляют первую линию защиты организма от внешней микробной или антигенной агрессии [Плехова Н.Г., 2006].

При попадании в организм патогенного микроба, он проходит ряд различных защитных линий. Прежде всего – эпителиальные покровы кожи и слизистых оболочек, которые обладают колонизационной резистентностью. Далее возбудитель, обладающий инвазивными факторами, может проникнуть в субэпителиальную ткань, где развивается острая воспалительная реакция [Климов В.В. и др., 2006]. Следующим барьером на пути патогена являются - лимфатические узлы, куда он транспортируется лимфой по лимфатическим сосудам. После преодоления этого барьера микроб по эфферентным лимфатическим сосудам проникает в кровь, где в ответ может развиваться системный воспалительный ответ. Если клетки крови не уничтожили патоген, то он разносится во внутренние органы, в связи с чем развиваются генерализованные формы инфекции [Дранник Г.Н., 2003].

Система неспецифического иммунитета включают четыре ее составляющие:

- первичные или анатомические барьеры: к ним относят кожу и слизистые оболочки;
- к физиологическим барьерам относят температуру, низкий уровень pH в желудке, гуморальные факторы, такие как лизоцим, интерфероны, эндогенные антимикробные пептиды, компоненты системы комплемента;
- к фагоцитарному барьеру относят такие клетки крови как, нейтрофилы и моноциты, а также тканевые макрофаги;
- к воспалительному барьеру относят хемокины, эйкозаноиды и ограничение воспалительных реакций в очаге поражения [Пашенков М.В., 2006].

1.1.2. Клеточные факторы врожденного иммунитета

В ходе эволюции в организмах многоклеточных сложились уникальные клетки, которые могут выполнять внутриклеточный киллинг. Под этим подразумевается основная их «профессия», так называемый фагоцитоз (от греч. phagos - пожираю, cytos - клетка) – это поглощение чужеродных микробов диаметром не менее 0,1 мкм и их дальнейшее уничтожение. Это явление было впервые обнаружено и сформулировано в 1883 г. советским ученым И.И. Мечниковым [Ярилин А.А., 2010].

К таким клеткам, которые осуществляют неспецифический иммунный ответ, относят фагоцитов: макрофаги, нейтрофилы и дендритных клеток, тучных клеток, базофилов, эозинофилов и естественных киллеров. Благодаря этим защитным клеткам происходит распознавание и уничтожение посторонних агентов путём фагоцитоза.

Данный процесс включает несколько последовательно проходящих стадий:

1. активация и хемотаксис – это двигательная реакция клетки к чужеродному объекту, происходящая в стороне, где повышается концентрация хемоаттрактантов, к которым относят хемокины, компоненты комплемента и микробной клетки, продукты деградации тканей организма;
2. адгезия или прикрепление агентов к мембране фагоцита. В процессе адгезии значимую роль выполняют Toll-подобные рецепторы, а также рецепторы к Fc-фрагменту иммуноглобулина и C3в- компоненту комплемента. Иммуноглобулины класса M, G, C3в-, C4в- компоненты комплемента увеличивают эффективность адгезии, т.к. являются опсонинами, кроме этого выполняют роль мостика между микробной клеткой и фагоцитом;
3. пожирание частиц, их дальнейшее попадание в цитоплазму клетки и образование вакуоли – фагосомы. Образовавшаяся фаголизосома – это клеточная органелла, которая необходима для реализации киллинга и расщепления фагоцитированных корпускулярных объектов [Мейл Д., 2007];
4. внутриклеточный киллинг или убийство и переваривание. После того, как произошло поглощение, частицы фагосомы объединяются с лизосомами, образуя фаголизосому. В дальнейшем в ней происходит гибель бактерий под влиянием бактерицидных продуктов гранул, так называемая кислороднезависимая система бактерицидности. В то же время происходит резкая потребность клетки кислорода и глюкозы и развивается уже респираторный (окислительный) взрыв, благодаря которому образуются различные токсичные метаболиты кислорода и азота: H_2O_2 , супероксиданион O_2^- , гипохлорная кислота, пироксинитрит, в свою обладающие высокой бактерицидностью - кислородзависимая система бактерицидности [Павлович С. А., 2005].

Клетки фагоциты, кроме функции фагоцитоза или эндоцитоза, могут исполнять свои цитотоксические реакции путем экзоцитоза, при выделении своих гранул наружу (дегрануляция). Тем самым фагоциты могут выполнять и внеклеточный киллинг.

С появлением специфического иммунного ответа моноклеарные фагоциты помогают участвовать в его механизмах путём представления антигенов Т-лимфоцитам [Шевцова З.В., 2008].

1.1.3. Роль лейкоцитарных показателей в иммунитете

Лейкоциты – неоднородная группа белых кровяных клеток, которые различны по своему внешнему виду и функциональным признакам [Гунин А.Г., 2006]. Каждая группа различна между собой по признакам наличия ядра и отсутствия самостоятельной окраски. Главной функцией данных клеток является - специфическая и неспецифическая защита организма от различных патогенных агентов. Кроме этого, они участвуют в осуществлении некоторых процессов при патологиях. Лейкоформула определяет относительное количество (%) 5 типов клеток: нейтрофилов (палочко- и сегментоядерные), лимфоцитов, моноцитов, эозинофилов и базофилов [Назаренко Г. И. , Кишкун А. А., 2005].

Одним из основных видов этой крупной группы, которые находятся в наибольшем количестве, являются зрелые сегментоядерные нейтрофилы. В норме от общего количества лейкоцитов крови их содержание составляет от 47 % до 72 %. Кроме этого, в их число входят юные нейтрофилы (1 - 5%), которые имеют в своей структуре палочкообразное сплошное ядро, являются незрелыми и не имеют характерную для зрелых нейтрофилов сегментацию ядра [Долгушин И.И., Бухарин О.В., 2001].

Нейтрофилы обладают способностью амёбоидного движения, эмиграцией за пределы кровеносных сосудов – экстравазации, и к

хемотаксису – целенаправленному движению к местам воспаления или повреждения тканей. Кроме этого, нейтрофилы рассматривают как основных клеток, которые участвуют в процессе фагоцитоза [Герасимов И.Г., 2005]. В отличие от моноцитов они мигрируют в очаг воспаления намного быстрее и осуществляют иммунную защиту. Являясь микрофагами, они пожирают относительно небольших по размерам инородных частиц или патогенных клеток. После захватывания и переваривания посторонних частиц нейтрофилы чаще всего погибают [Гомоляко И.В., 2003], при этом освобождают фермент - миелопероксидазу, который при окислении до гипохлорита обладает сильным антибактериальным действием [Маянский А. Н., 1999].

Таблица №2.

Функциональные различия нейтрофилов и моноцитов/макрофагов

Свойство	Нейтрофилы	Моноциты/макрофаги
Сроки жизни	Короткий (3–5 сут)	Длительный (недели, месяцы)
Темп мобилизации и активации	Быстрый (минуты)	Более медленный (часы)
Длительность активации	Короткая (минуты)	Длительная (часы)
Способность к пиноцитозу	Умеренная	Высокая
Способность к фагоцитозу	Очень высокая	Высокая
Регенерация мембраны	Отсутствует	Происходит
Реутилизация фагосом	Невозможна	Возможна
Нелизосомная секреция	Отсутствует	Имеется
Fc-рецепторы	FcγII, FcγIII; при активации — FcγI	FcγI (спонтанно), FcγII, FcγIII

Эозинофилы содержатся в крови человека в небольшом количестве, примерно 1-5%. В своем строении имеют двудольчатое ядро, что является отличительным свойством от подобных клеток. Еще в их структуре

выделяют крупные, размером до 1 мкм, так называемые эозинофильные гранулы (специфические, вторичные). Кроме этого, в эозинофилах зрелого состояния обнаруживают три других типа гранул — это первичные, мелкие гранулы и липидные тельца. Как и для нейтрофилов характерна фагоцитарная активность, но слабая. В отличие от них они захватывают более крупные клетки, чем бактерии, например, паразитические черви [Bohm M. et al, 2010]. При активации в них могут образовываться и секретироваться различные антибактериальные вещества. Например, активные формы кислорода, перекиси, производные оксида азота, цианидов и галогенов. Существенным свойством эозинофилов является — экспрессия Fc-рецепторов, специфичных для иммуноглобулинов класса E. Они принимают свое участие в тканевых реакциях организма на паразитарные, аллергические, инфекционные и аутоиммунные заболевания [Анаев Э. Х., 2003].

Базофилы — наиболее малочисленная группа клеток крови, обладающие S-образным ядром, очень крупными размерами. Они содержатся в крови человека в количестве 0-1% от числа лейкоцитов. В составе их гранул содержатся в достаточном количестве гистамин, серотонин, простагландины и другие медиаторы аллергии и воспаления, поэтому при микроскопии ядро редко можно обнаружить из-за перекрытия цитоплазмы данными медиаторами. Эти клетки принимают участие в различных аллергических и клеточных воспалительных процессах, так называемых реакциях немедленного типа. Еще их называют реакциями анафилактического шока [Falcone F. H., 2006]. Базофилы могут участвовать в немало важных процессах, как хемотаксис и фагоцитоз. Однако эти функции не основные для них. Особенной их функцией является мгновенная дегрануляция – процесс разрушения гранул, которая ведет к увеличению кровотока, проницаемости сосудов, росту притока жидкости и прочих гранулоцитов [Yoshimoto T., 2010].

Моноцит является наиболее активным, крупным по размерам в отличие от других фагоцитов периферической крови, имеющий крупное, бобовидное, несегментированное ядро. Они имеют псевдоподии, т.е. выросты цитоплазмы, благодаря которым обладают активным амебоидным движением, кроме этого владеют процессами экстравазации и хемотаксисом. Одним из основных отличительных черт является то, что они макрофаги [Пинегин Б.В., 2009], то есть могут пожирать сравнительно немалые частицы и клетки, и, как правило, они после поглощения могут не погибать [Auffray C., 2009]. Макрофаги выполняют противоопухолевый, противовирусный, противомикробный и противопаразитарный иммунитет, производя цитотоксины, IL, ФНО, интерферон. Эти свойства обусловлены и наличием в их структуре различных оксидантов, таких как супероксиды, перекиси водорода и др. Кроме этого, они способны принимать участие в регуляции кроветворения, в формировании специфического иммунного ответа организма [Geissmann F., 2003].

В тканях некоторые моноциты могут образовываться в резидентные тканевые макрофаги. Это случается под воздействием тканевого микроокружения и сопровождается дифференцировкой новых клеток. Моноциты синтезируют отдельные компоненты системы комплемента. Макрофаги также обладают свойством участвовать в выработке антигенов и доставлять их Т-клеткам для узнавания и обучения. Таким образом, они считаются антигенпрезентирующими клетками иммунной системы [Белевитина А. Б., 2006].

1.1.4. Адаптивный иммунитет

Адаптивный или приобретенный иммунитет обладает высокой специфичностью касательно любого конкретного возбудителя. Данный тип иммунитета имеет два основных свойства: специфичность и иммунологическая память.

Специфический иммунитет образует новые клоны клеток, сохраняющие опыт прошлого иммунного ответа. Благодаря этому при вторичной встрече с каким-либо чужеродным агентом эти клетки помогают действовать на них существенно быстрее, при этом вырабатывается иммунный ответ более сильного характера. Это свойство называют иммунологической памятью, и является основным преимуществом перед врожденным иммунитетом, потому что организм становится намного устойчивым к многообразным патогенам.

Основными клетками, которые формируют иммунный ответ, являются лейкоциты. Их существует несколько разновидностей. Они выполняют главнейшую роль в участии основания специфического иммунитета, ведь эти клетки узнают конкретный чужеродный агент, даже при повторной встрече и не зависимо от того, где находится данный патоген, внутри или вне клетки [Kuprer T.S., 2004].

По литературным данным выделяют две главных популяций лимфоциты: Т-лимфоциты и В-лимфоциты. В-клетки, образуя антитела (АТ), действуют против внеклеточных возбудителей и образования их метаболитов. В свою очередь образованные АТ обладают способностью специфически узнавать и соединять найденные молекулы-мишени - антигены. В этом случае антигенами могут выступать некоторые молекулы, находящиеся на мембране микроорганизмов или токсины, образуемые ими. Разные популяции Т-клеток обладают обширным спектром действий. Например, некоторые из них принимают участие в регуляции деления В-клеток и формирования АТ. Другой тип клеток может взаимодействовать с фагоцитирующими клетками, при этом помогают им в переваривании поглощенных патогенных агентов. И наконец, последняя группа Т-лимфоцитов узнает и пожирает клетки, которые инфицированы вирусами [Ройт, 2000].

Подводя итог, можно сделать вывод, что специфический иммунитет основывается на трех основных процессах:

1. распознавание чужеродных агентов, независимо от того, патогенны они или нет, благодаря клонально распределенных рецепторов;
2. элиминация узнанных посторонних агентов;
3. формирование иммунологической памяти, которая позволяет быстрее и действеннее удалять антигена при вторичном распознавании.

Кроме этого, у приобретенного иммунитета выделяют еще одно преимущество, которое так же отсутствует у врожденного — это способность защищать организм от агрессии изнутри, т.е. от злокачественных новообразований.

1.2. Липополисахариды

1.2.1. Структура молекул липополисахаридов

Липополисахарид (ЛПС) представляет собой особую структуру, которая присуща только грамотрицательным бактериям, и является специфическим компонентом их наружной мембраны. Открытие этого бактериального компонента относится к концу 19 века, когда Р. Приффер выделил из клеток *V.cholerae* термостабильное вещество, которое в дальнейшем был назван эндотоксином. В 1935 году А.Boivin и L.Messrobianu с помощью экстракции ТХУ выделили макромолекулярный комплекс полисахарида, липида и белка внешней мембраны бактерий [Muller-Loennies S. et al., 2007)]

Термин «липополисахарид » означает бактериальный препарат, очищенный от белковых и фосфолипидных примесей [Варбанец Л.Д., 2006]. Все липополисахариды грамотрицательных бактерий имеют общий план строения. ЛПС представляет собой амфифильную молекулу, в структуре которой имеется гидрофобная и гидрофильная части. ЛПС состоит из трех основных блоков: блок О-антигена, олигосахарида

сердцевины и липида А (рис. 1). Такая химическая структура ЛПС характеризуется определенными антигенными и биохимическими свойствами.

О-антиген представляет собой полисахаридный полимер, состоящий из последовательности повторяющихся одинаковых олигосахаридов (от трех до восьми моносахаридов каждый), которые определяют видовую специфичность и серологическую особенность штамма бактерий. Прилегающая к мембране часть О-полисахаридной цепи не отличается разнообразием и представляет собой более короткие участки цепи [Stenutz et al., 2006].

Олигосахарид сердцевины имеет более консервативную структуру, чем О-антиген. Внутренняя область представлена 3-дезоксид-манно-2-октулозоновой кислотой - гептозой и внешней части, которая состоит из гексоз. К остаткам гептозы могут быть присоединены неорганические заместители (фосфаты, пирофосфаты и т.д.), которые и определяют заряд данной части молекулы ЛПС. В составе клеточной стенки бактерий, образующих шероховатые колонии (R-колонии), входит ЛПС, у которых отсутствует олигосахаридный кор, а образующие S-колонии содержат полноценный эндотоксин [Волошина Е.В., 2010].

И, наконец, липид А является гидрофобной и наиболее консервативной частью молекулы ЛПС и отвечает большей частью за его пирогенные свойства, в том числе, за его иммуномодулирующую активность [Galanos C. et al., 1984]. Липид А является сложной молекулой, в состав которой выходят такие соединения, как глюкозамин, остатки фосфорной кислоты и жирные кислоты. Углеводный скелет в основном представлен дисахаридом глюкозамина. У различных штаммов липид А отличается: наличием фосфатов, количеством жирных кислот и их распределением дисахаридном скелете. В водных растворах липид А образует мицелярные структуры [Бондаренко В.М. 2013].

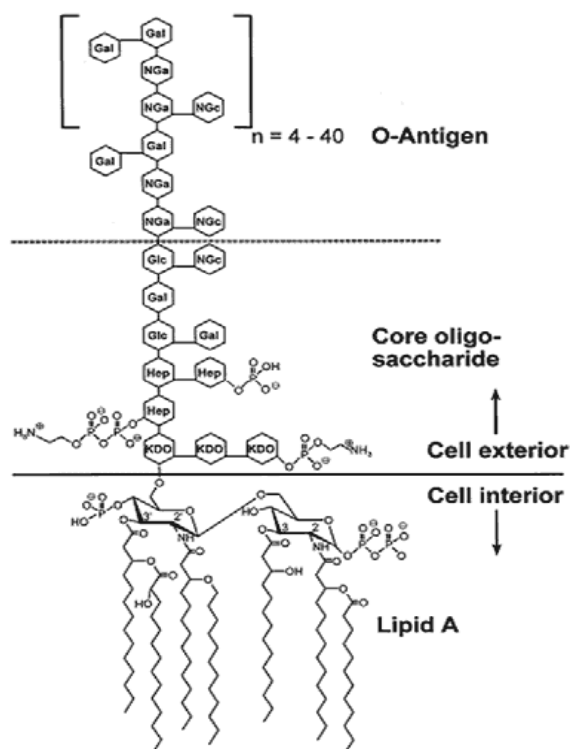


Рисунок 1. Химическая структура эндотоксина из *E. coli*
[Ohno and Morrison, 1989].

1.2.2. Иммунобиологические свойства ЛПС

ЛПС выполняет ряд функций, стимулирующих иммунную систему макроорганизма. Например, непосредственное отношение к сопротивлению бактериальным инфекциям имеют провоспалительные цитокины - IL-1, IL-6 и фактор некроза опухоли (ФНО), синтез которых инициирует ЛПС [Kaufmann S.H.E., Inge F.E.A., 1990; Janeway C.A., Travers P., 1994]. Все они действуют как экзогенные пирогены, стимулируя синтез IL-1 и ФНО с последующим выделением IL-6 и синтезом простагландинов E2, и являются стимуляторами гемопоэза [Dinarello C.A., 1994]. Кроме этого, ЛПС значительно повышают антибактериальную активность лейкоцитов [Dinarello C.A., 1989], индуцируют синтез острофазных белков, которые, в свою очередь, увеличивают

эффективность фагоцитоза [Janeway C.A., Travers P., 1994]. Все эти механизмы направлены на повышение неспецифической защиты макроорганизма против инфекции, а подобные эффекты ЛПС на иммунокомпетентные клетки рассматриваются как иммуномодулирующая активность [Семенова И.Б., Акатов А.К., 1991].

Одно из наиболее выраженных проявлений иммунокорректирующего действия ЛПС – это способность повышать фагоцитарную активность макрофагов [Лоррнов Н., 1990]. Чаще всего ЛПС обуславливает мощную стимуляцию макрофагального эндоцитоза при его введении в организм, что увеличивает клиренс неорганических тест-частиц или микробов системой мононуклеарных фагоцитов. Исходя из литературы, макрофаги, извлеченные из организма примированных ЛПС животных, в течение достаточно длительного времени сохраняют свою фагоцитарную активность [Сибиряк СВ., Алехин Е.К., 1991]. Кроме того, ЛПС влияет на рецепторы мембраны макрофагов и резко усиливает их секреторную активность [Сибиряк СВ., Алехин Е.К., 1988; Henderson B. et al., 1996]. Таким образом, препараты ЛПС способны повышать устойчивость к инфекции за счет мобилизации различных антиинфекционных механизмов макроорганизма.

Как установлено, иммуномодулирующее действие ЛПС обеспечивается, в основном, липидом А [Duncan R.L. et al., 1986]. Известно, что некоторые клетки, защищающие организма, например, нейтрофилы и макрофаги обладают способностью ферментативно конвертировать структуру липида А, снижая его токсичность и одновременно сохранять иммуностимулирующую активность [Munford R.S., Hall C.L., 1985, 1986; Peterson A.A., Munford R.S., 1987; Munford R.S., 1988]. Информация о таких важных механизмах этой модификации является ценным материалом для создания искусственных аналогов липида А и нетоксичных форм ЛПС.

В настоящее время ЛПС является удобным инструментом иммунологического анализа и фармакологической коррекции иммунного ответа. Так, природные ЛПС из *S.marcescens* и *Ps.aeruginosa* широко применяются в качестве стимуляторов неспецифической резистентности организма в виде фармакологических препаратов продигиозана и пирогенала [Сибиряк СВ., Алехин Е.К., 1988]. Вместе с тем, ЛПС является не только модулятором неспецифической защиты, но и важнейшей бактериальной структурой, участвующей в формировании специфического иммунного ответа хозяина против патогенного агента [Яковлев М.Ю., 2003].

1.2.3. Распознавание ЛПС как «чужого» в системе врожденного иммунитета

Первой линией защиты макроорганизма при попадании микроорганизмов (антигенов) или высвобождении их эндотоксинов в кровотока является врожденная иммунная система. При этом в данном процессе участвуют основные клетки неспецифического иммунитета, а именно, нейтрофилы, макрофаги и др. [Akira S., 2003]. В конце 20 века ученый Ch. Janeway совместно с Р. Меджитовым открыл и предположил, что основой разделения «своего» и «чужого» в системе врожденного иммунитета являются так называемые паттерн-распознающие рецепторы (ПРР). Janeway объяснил это тем, что для того, чтобы выработались антитела против антигена к первичному сигналу от самого патогена, необходим дополнительный сигнал (вторичный) от антиген-презентирующих клеток [Brade H. et al, 1999]. При этом данный вторичный сигнал происходит при распознавании консервативных структур, которые при этом ассоциированы с микроорганизмами – патогенами. Такие

структуры получили название патоген-ассоциированных молекулярных паттернов (ПАМП) [Janeway C.A. Jr., Medzhitov R., 2002; Bryant C.E. et al., 2010].

Распознавание этих патоген-ассоциированных молекулярных паттернов при помощи паттерн-распознающих рецепторов приводит к началу защитного механизма, который заключается в продукции провоспалительных цитокинов и интерферонов I типа, таких как, ИФН- α , ИФН- β , блокирующие распространение инфекции в организме. Ответ врождённой иммунной системы необходим не только для уничтожения патогена, но и для запуска специфического адаптивного иммунного ответа с участием Т- и В-лимфоцитов [Beutler B.A., 2009].

ПРР для липополисахарида бактерий относятся к трансмембранным белкам I класса и известны как Toll-подобные рецепторы - TLR (toll-like receptors) [Medzhitov R. et al., 1997; Poltorak A. et al., 1998]. У человека данные рецепторы распознают большой спектр продуктов микроорганизмов с консервативными структурными паттернами, присутствующими у бактерий, грибов и вирусов [Matsushima N. et al., 2007].

Toll-рецептор изначально был обнаружен у насекомых *Drosophila melanogaster* в качестве рецептора, необходимого для дорсовентральной полярности во время процессов эмбриогенеза. TLR относятся к большому семейству TIR-рецепторов и являются интегрированными, трансмембранными гликопротеинами 1 типа. В своем строении имеют поверхностный, внеклеточный домен, который отвечает за связывание лиганда. Он в своем строении имеет NH₂-конец аминокислотной последовательности и включает 19-25 участков, которые богаты лейцином (LRR). За ним находится переходный участок, который отвечает за то, чтоб рецептор прикрепился к мембране клетки, который тот в свою очередь, обогащен цистеином. Выделяют еще и внутреннюю (С - концевая) часть рецептора, представленная Toll/IL1-receptor (TIR) – доменом [Shizuo A.,

2003]. Данный рецептор получил название из-за того, что этот участок одинаков у TLR и у рецепторов цитокинов семейства IL-1 [Dinarello C.A., 1989]. При этом TIR отвечает за адапторные сигнальные молекулы.

У млекопитающих, в том числе и у человека, Toll-подобным рецептором специфичным к ЛПС является TLR 4 типа [Leon C.G. et al., 2008]. При множественных исследованиях было доказано, что именно TLR 4 типа, а не TLR 2 типа являются рецептором, обеспечивающим активацию клеток в ответ на ЛПС [Tapping R.I. et al., 2000].

Для распознавания липополисахарида грамотрицательных бактерий необходимо для начала его высвобождение из клеточной стенки. Это происходит при участии 4 молекул, а именно, ЛПС-связывающего белка - LBP, CD14, TLR4 и MD-2. Мембранные молекулы CD14 [Loppnow H., 1995] и MD2 производят многие клетки, включая моноциты, макрофаги, лимфоциты, эндотелиальные и эпителиальные клетки. Toll-подобный рецептор 4 типа часто экспрессируется на полиморфоядерных лейкоцитах, моноцитах, макрофагах, лимфоцитах и дендритных клетках [Bosshart H., Heinzelmann M., 2007]. ЛПС-связывающий белок (LPB) или белок острой фазы вырабатывается гепатоцитами печени [Jerala R., 2007]. Циркулируя в кровеносном русле организма, он распознаёт и связывается одной из частью липополисахарида (липидом A), при этом способствует экстракции мономера ЛПС и дезагрегации мицеллы, в которой скапливаются ЛПС при выходе в кровоток из бактериальных клеток в результате роста или лизиса [Miyake K., 2006]. CD14 представляет собой димер, N-концевой участок. У этой молекулы не имеется эндоплазматический домен, поэтому для передачи сигнала требуются вышеуказанные трансмембранные белки – TLR 4 типа и MD-2 [Shizuo A., 2003].

1.3. Иммуномодуляторы, их классификация

Иммуномодуляторы (ИМ, иммунокорректоры) – это лекарственные препараты природного или синтетического происхождения, которые обладают способностью нормализовать иммунную систему. Их широко применяют при всевозможных аллергических заболеваниях и воспалениях, которые протекают в стадии хронического течения, инфекциях, вызванные вирусами, а также при других тяжелых заболеваний [Пинегин, 2000].

На данный момент выделяют три группы иммуномодуляторы по происхождению:

I. Эндогенного происхождения, подразделяющиеся на:

1. Иммунорегуляторные пептиды;
2. Цитокины;
3. Интерфероны;
4. Иммуноглобулины;

II. Экзогенного происхождения, к ним относятся:

1. Препараты бактериального происхождения;
2. Препараты грибкового происхождения;

III. Химически чистые и синтезированные, среди которых выделяют:

1. Вещества, которые получают при помощи химического синтеза направленного характера;
2. Препараты, которые обладают иммуностимулирующим влиянием;
3. Различные аналоги ИМ эндогенного происхождения.

Существует 3 поколения экзогенных иммуномодуляторов микробного происхождения. Одним из самых первых препаратов, обладающий иммуностимулятором, была вакцина БЦЖ (лат. BCG), которая инициирует продукцию факторов как адаптивного, так и врожденного иммунитета.

Кроме этого, к данной группе иммуномодуляторов относят такие лекарственные препараты, как пирогенал, сальмозан и продигиозан. По

происхождению они представляют собой полисахариды бактериальных клеток. Эти препараты имеют историческое значение и в настоящее время редко применяются, так как они пирогенны и обладают различными побочными эффектами [Маркова Т.П., 2001].

Ко второму поколению микробных иммуномодулирующих препаратов относят лизаты и рибосомы (Рибомунил) бактерий, выделенные из представителей родов *Klebsiella*, *Streptococcus*, *Haemophilus* и др [Cahot E. et al., 2000]. Лизаты представляют собой продукты расщепления бактериальных клеток и из них изготавливают такие лекарства, как Бронхомунал, ИРС-19, Имудон, Бронхо-Ваксом. В настоящее время данные лекарства специалисты советуют все чаще, так как их они применяются при профилактике инфекционных болезней дыхательной системы. Кроме этого, они обладают двойным назначением: специфическим (вакцинирующим) и неспецифическим (иммуностимулирующим) [Книрель В.А. и др., 2012.].

Из группы препаратов третьего поколения можно выделить один из наиболее применяемых в клинике - ликолипид, который представляет собой природный дисахарид – глюкозаминилмурамил, к нему также добавлен дипептид синтетического типа – L-аланил-D-изоглутамин. Главной целью ликолипида в организме человека являются фагоцититарные клетки иммунной системы. Влияя на данные клетки, увеличивается свойство пожирания и внутриклеточного киллинга патогенов, усиливаются цитотоксические свойства макрофагов по отношению к бактериальным и инфицированным вирусом клеткам, увеличивается продукция ряда цитокинов (ИЛ-1, TNF-α, γ-ИФН и др.), что проявляет стимулирующее действие на синтез антител и пролиферацию Т- и В-клеток [Андропова Т.М., 2008].

В России одним из первых препаратов тимической группы использовался Тактивин, который в своем составе представлен комплексом белков, выделенные из тимуса крупного рогатого скота, в данном случае коров. Тактивин нормализует количественные и

функциональные характеристики Т-клеток иммунной системы, стимулирует образование лимфокинов и т.д. Такие препараты, как Тималин, Тимоптин и т.д. являются сходными по составу с Тактивином, т.к. содержат тимические пептиды, а лекарства Тимостимулин и Вилозен в своем содержании имеют лишь экстракты тимуса. Препараты тимического происхождения обладают выраженным иммуномодулирующим эффектом, но в связи с тем, что они представляют собой смесь неразделенных веществ и их сложно стандартизировать – это является их недостатком [Машковский М.Д., 2007].

Со временем появились препараты 2 и 3 поколения, которые являются подобиями синтетического происхождения гормонов тимуса и их частей, обладающие биологическими активностями. Такая направленность препаратов данной группы препаратов стало очень перспективным. Например, на основании фрагмента, который включает остатки аминокислот гормона тимопоэтин, создали гексапептид синтетического происхождения – Иммунофан [Хаитов и др., 2003].

Основоположником лекарственных средств из костного мозга (КМ) является миелопид. Он включает систему из 6 миелопептидов, которые продуцирует клетки КМ свиней. Вначале намеревалось, что группа препаратов костномозгового происхождения будут инициировать лишь звенья гуморального иммунитета. При дальнейшем изучении разных групп миелопептидов открыли, что каждый класс проявляет влияние на определенные клетки иммунитета. К примеру, миелопептид-1 увеличивает действенность Т-клеток, а миелопептид-4 влияет на процесс дифференцирования стволовых клеток. После того как расшифровали аминокислотный состав природных миелопептидов создали их аналоги синтетического происхождения (серамил – в основе которого лежит миелопептид – 3, бивален – миелопептид -2) [Прохоренко и др., 2004].

Цитокины – это низкомолекулярные подобные гормонам молекулы, которые продуцируются активированными клетками иммунной системы. В

основе всех синтетических и природных иммуномодулирующих лекарственных препаратах лежат цитокины. [Галактионов В. Г. , 2005.].

Выделяют две группы, одна из которых в основе содержит лейкинферон и суперлимф, другая - беталейкин, интерлейкин - 2, лейкомакс. Препарат лейкинферон в своем комплексе включает цитокины [Беляев Д. Л., Цымбалов О. В. и др., 2005] эффекторной фазы иммунитета, которые получают *in vitro*. В составе представлены ИЛ-1, ИЛ-6, ИЛ-8, факторы индукции клеток макрофагального звена, факторы некроза опухоли α , интерферон α . На подобии этого препарата существует - Суперлимф, который необходим для местного применения и выступает в роли иммуномодулирующего препарата локального действия цитокинового происхождения. Препарат Интерлейкин – 2 содержит сам ИЛ-2, являющийся одним из самых основных цитокинов, регулирующий иммунную систему человека [Егорова В.Н., 2012]. Реализовывается биотехнологическое производство этого препарата. В качестве продуцентов рекомбинантного ИЛ–2 используют некоторые штаммы дрожжей. Препарат Беталейкин включает в своем составе рекомбинантный ИЛ-1 β , который играет немаловажную роль в формировании воспалительной реакции и активации факторов специфического иммунитета. Лекарственный препарат, как и интерлейкин – 2 получают с помощью биотехнологических методов, клетками-продуцентами которых являются рекомбинантные штаммы *Escherichia coli*, с геном продукции ИЛ – 1 [Поляков и др., 2007].

Среди лекарственных средств, в составе которых лежат нуклеиновые кислоты (НК), в медицинской практике применяют Нуклеинат натрия. Он содержит в составе предшественников НК, которые усиливают способность размножения и роста некоторых клеток. При дальнейшем изучении эффектов данного препарата, было выяснено, что он способствует инициации всех звеньев иммунитета. Этот препарат был одним из первых в своей группе, который прошел, различные клинические

проверки и был разрешен к использованию в качестве иммуномодулятора и стимулятора лейкопоэза [Павлова И.Н. и др., 2009]. К таким же препаратам относят деринат и полудан – это НК, которые выделены из рыб, ридостин – РНК, получен из дрожжей. Так же были разработаны аналоги данных лекарственных средств синтетического происхождения, например, синтетический полудон. Кроме этого, условно к данной группе относят инозин Пранобекс, который является комплексным соединением, состоящий из гипоксантина-рибозида. В зарубежных странах все вышеперечисленные препараты данной группы применяются в медицине в качестве иммуномодуляторов. Однако необходимо иметь в виду, что эти лекарственные средства обладают выраженным стимулирующим интерферон эффектом и при их использовании следует помнить, что они индуцируют процесс размножения про – и эукариотических клеток. К примеру, Нуклеата натрия может спровоцировать колонизацию бактерий [Веремейченко и др., 2008].

За границей на данный момент часто используют в качестве иммуномодуляторов препараты растительного происхождения. К ним относятся такие препараты как Иммунал, Эхинацин ликвидум, Эхинацея композитум С. В РФ они зарегистрированы, как иммуномодулирующие средства. Но к препаратам растительного происхождения правильнее понимать, что они являются как полезные пищевые добавки, а не как лекарственные препараты.

Группу химически чистых иммуномодуляторов разделяют на 2 класса – высокомолекулярных и низкомолекулярных препаратов. К первой группе относят те препараты, которые обладают иммуномодулирующей способностью. Первым из данных иммуномодулирующих средств был Левамизол, у которого было выявлено выраженное иммуностимулирующее действие [Ковалев И.Е., 1980]. По химическому составу к Левазолу достаточно близок препарат дибазол, однако он обладает меньшим эффектом. Он является производным имидазола, и

многие рекомендуют его как профилактическое средство, повышающий иммунитет. Так же в этой подгруппе препаратов выделяют диуцифон, в составе которого находятся производные сульфоновой кислоты, проявляющие ещё и бактерицидные свойства. При присоединении к данной кислоте метилурацила создаются дополнительные иммуностимулирующие свойства. Создание таких лекарств является перспективой в направлении развития учения об иммуномодулирующих препаратах. Еще одним эффективным препаратом первой группы является – Галавит. Его особенностью является то, что кроме иммуномодулирующего эффекта он обладает сильным противовоспалительным действием [Коробкова Л.И. и др., 2004]. Так же в этой группе можно выделить препарат гаптон, который состоит из 14 аминокислот. Он аналогично перечисленным выше лекарствам обладает двойным эффектом – иммуномодулирующим и противовирусным [Хаитов, 2004].

Препараты второй группы образуются при химическом синтезе направленного характера. К этой подгруппе препаратов относят Полиоксидоний, он является N-оксидированным производным полиэтиленпиперазина, который по строению напоминает вещества естественного происхождения. N-оксидированные группы в большом количестве обнаруживают в организме человека, так как через образование N-оксидов получается синтез азотистых оснований. Полиоксидоний проявляет иммуномодулирующие, детоксицирующие, антиоксидантные и мембранопротекторные свойства [Караулова А.В., 2008].

К иммуномодулирующим лекарственным препаратам, безусловно, можно отнести интерфероны и индукторы интерферонов. Они являются факторами неспецифической защиты организма от вирусов, бактерий, хламидий, патогенных грибов, опухолевых клеток, и в то же время выступают как регуляторы межклеточных взаимодействий в системе иммунитета.

К препаратам, оказывающим иммуномодулирующий эффект, относят иммуноглобулины. Из данной группы можно выделить, такие как - иммуноглобулин человеческий, интраглобин, октагам, пентаглобин, сандоглобулин и т.д. Они являются основной заместительной терапией, поэтому их считают жизненно необходимыми лекарственными препаратами [Ершов Ф. И., 2007].

И наконец, иммуномодуляторы бактериального происхождения являются одними из самых эффективными препаратами, в силу того, что они воздействуют как на адаптивный, участвуя в стимуляции синтеза иммуноглобулинов класса М, О, А, так и врожденный иммунитет, активируя факторы естественного иммунитета. Кроме этого, бактериальные ИМ обладают защитным действием не только против бактерий, лизаты которых входят в состав конкретного препарата, но и против вирусов, грибов [Маркова Т.П., 2000]. Использование бактериальных ИМ снижает персистенцию чужеродных патогенов в дыхательной системе, что считается одним из важных моментов в лечении, а также профилактике обострения бронхита и хронической обструктивной болезни легких (ХОБЛ). Назначают бактериальные ИМ и с целью профилактики респираторных инфекционных заболеваний или в комплексном лечении также помогает уменьшить необходимость в употреблении антибиотиков, а также в 2-3 раза понизить частоту, тяжесть и длительность рецидивов.

1.4. Строение и химический состав грамотрицательных бактерий

Строение бактериальной клетки значительно отличается от животных и растительных клеток. Несмотря на то, что их размеры малы, все же внутренняя организация бактерий сложна. В клетках бактерий

выделяют основные и временные компоненты. К первой группе относятся клеточная стенка, цитоплазматическая мембрана (ЦПМ), цитоплазма, рибосомы, а также различные запасные питательные вещества (включения) и нуклеоид.

Любая бактерия покрыта жесткой оболочкой, поверхностным слоем - клеточной стенкой. Этот компонент располагается снаружи от ЦПМ и выполняет множественные функции. Во-первых, она обеспечивает поддержание постоянной формы бактериальных клеток. Во-вторых, она является механической защитой от условий окружающей среды и препятствует проникновению различных вредных веществ вовнутрь клетки. В-третьих, благодаря клеточной стенке осуществляется транспорт питательных веществ, а также и выделение метаболитов. Толщина клеточной стенки достигает от 50 до 70 нм и составляет примерно 20% сухого вещества от самой клетки. Кроме вышесказанных основных функции существует еще дополнительные, такие как: участие в процессе деления клетки, определение антигенной характеристики бактерий, взаимодействие с бактериофагами и бактериоцинами благодаря наличию рецепторов на клеточной стенке. Оболочка в своем строении имеет поры, которые участвуют в избирательном проникновении питательных веществ из окружающей среды вовнутрь [Lugtenberg et al., 1983].

В 1884 году датский врач Г.К.Грам предложил метод дифференцирования бактерий по биохимическим свойствам клеточной стенки на грамположительные и грамотрицательные. Суть данного метода заключается в том, что грампозитивные бактерии крепко соединяют два красителя: генцианвиолет и раствор Люголя, которые не обесцвечиваются этиловым спиртом и не принимают в свой комплекс еще один краситель фуксин, тем самым окрашиваются в фиолетовый цвет. Грамнегативные бактерии окрашиваются в красный цвет фуксином, так как данный комплекс красителей (генцианвиолет + раствор Люголя) вымывается при обесцвечивании этанолом [Ченцов Ю.С., 2004].

Такое явление зависит от химического состава бактерий, и он разнообразен. Грамотрицательные бактерии в своем строении клеточной стенки имеют большое количество жиров (около 75%), вместе с ними связаны также белки и углеводы. Так же выделяют еще слой муреина (5-10%), представляющий собой цепочку из N-ацетилглюкозамина и N-ацетилмурамовой кислоты и является опорным каркасом для других веществ. Строение стенки грамположительных бактерий устроено значительно сложнее. Клеточная стенка этих бактерий многослойная. Имеется толстый слой муреина, составляющий примерно 95% от всего содержания стенки [Захарова И.Я., 1982]. За ним располагается плотно упакованный слой белковых молекул. Над ним еще имеется слой липополисахаридов, к которым приобщены липопротеиды (примерно 5%) [Игнатов и др., 2009].

Еще одним из важнейших обязательных компонентов бактериальной клетки является цитоплазматическая мембрана (ЦПМ) или плазмолемма. Она представляет собой полупроницаемую, тонкую пленку толщиной 7-10 нм. Состоит из трех слоев и отграничивает внутреннее содержимое клетки от вышеуказанной клеточной стенки. Компоненты ЦПМ составляют около 8-15 % сухого веса бактериальной клетки. Как и другие биологические мембраны, ЦПМ бактерий по биохимическому строению состоит из белково-липидного комплекса, причем белки составляют около 20-75 %, а липиды - 25-40% [Bruce Alberts et al, 2008]. Цитоплазматическая мембрана участвует в важнейших процессах жизнедеятельности клетки. Она играет роль осмотического барьера клетки, принимает участие в процессах обмена веществ, осуществляет рост бактерий, контролирует поступление и выход различных органических и неорганических соединений.

Под цитоплазматической мембраной находится цитоплазма. Она занимает наибольшую часть бактериальной клетки, имеет вид гомогенной консистенции и содержит в своем составе до 90 % воды. Гомогенная фракция цитоплазмы, называемая цитозолем, содержит следующие

компоненты - набор РНК, в частности мРНК и тРНК, ферментные белки, продукты и субстраты метаболического обмена. Остальная часть цитоплазмы включает в своем содержании нуклеоид, рибосомы, внутрицитоплазматические мембраны, которые могут быть или не быть. Таким образом, цитоплазма образует внутреннюю среду бактерий, связывает все структуры, находящиеся внутри клетки и служит для реализации основных функций организма [Джеральд М. и др., 2006].

Цитоплазма бактерий содержит в своем составе рибосомы. Это сложные образования сферической формы, которые являются белоксинтезирующими частицами. Диаметр органоида составляет 16-20 нм. Они содержат различные молекулы РНК и связанные с ними молекулы белков. В клетках прокариот насчитывается от 5 до 50 тысяч рибосом в зависимости от возраста клетки. Рибосомы бактериальных клеток состоят из 2 субъединиц, малой и большой. В свою очередь они обладают по Свёдбергу коэффициентами седиментации 50S и 30 S, соответственно. Они объединяются между собой перед процессом трансляции. Существует еще один тип объединения рибосом, называемые полисомами. Это когда единичная молекула мРНК связывает несколько рибосом в виде бус, нанизанные на нить. Функция рибосом заключается в синтезе необходимых для жизнедеятельности бактериальной клетки белков [Улумбеков Г. Э., 2007].

В цитоплазме можно обнаружить различные включения, которые имеются в микробной клетке не все время, а лишь тогда, когда они необходимы для нее. Это может быть связано как с условиями окружающей среды, так и разнообразными физическими и химическими факторами. Многие цитоплазматические включения являются запасными питательными веществами, которые помогают организму выжить в неблагоприятных условиях. Эти гранулы могут быть представлены как крахмал, гликоген, сахара и другие вещества. Кроме этого, существуют еще другие распространенные виды гранул, например, волютин. Этот вид

включений состоит из химического соединения - полиметафосфата, служащий источником фосфатных групп и энергией для микробной клетки. Их бактерии накапливают чаще всего в условиях, где дефицитным соединением является сера. Однако в цитоплазме некоторых серных бактерий есть включения серы [Красикова, 2009].

Важнейшим структурным компонентом клетки, осуществляющий реализацию генетического материала, является нуклеоид. Еще называют его аналогом или эквивалентом ядра прокариот. Так как в микробной клетке нет ядерной мембраны, то нуклеоид чаще всего сконцентрирован в центральной зоне цитоплазмы. Он находится в виде замкнутого кольца и плотно уложен в суперспирализованную двухнитчатую молекулу ДНК. Нуклеоид составляет примерно 2-3% от общей сухой массы клетки. Данный органоид не имеет мембрану, ядрышко, набором хромосом и белки-гистоны. Различают два типа нуклеоида: дискретный и состоящий из отдельных фрагментов. Это зависит от функционального состояния клетки. Под понятием дискретность понимается деление клетки и репликация молекулы ДНК. Основные функции нуклеоида: во-первых, является носителем генетической информации микробной клетки, во-вторых, осуществляет реализацию генетического материала. Наряду с нуклеоидом существуют еще так называемые автономные факторы наследственности – плазмиды. Они представляют собой молекулы ДНК с меньшей молекулярной массой и способны к автономной репликации [Быков В. Л., 2002].

На поверхности бактерий имеются специальные структуры, которые являются для них органами передвижения – жгутики. Органоид фиксируется под ЦПМ при помощи 2 пар дисков. Наличие жгутика, а также их количество является характерным признаком, позволяющий дифференцировать бактерии. Располагаться они могут и на одном конце клетки, и на двух концах и даже по всей поверхности. Бактериальные жгутики состоят из 3 субструктур:

1. белок — флагеллин, представляющий собой тонкие скрученные нити;
2. крюк — является более толстым, чем филамент;
3. базальное тело или трансмембранный мотор.

1.5.Семейство *Enterobacteriaceae*

Семейство Enterobacteriaceae считается самым большим семейством, так как в нем выделяют больше 45 родов микроорганизмов. Данное семейство имеет общее местообитание – кишечник. Одним из основных родов семейства Enterobacteriaceae является род *Escherichia*. Он имеет промежуточное место по содержанию ГЦ-пар в ДНК и наиболее близкими к нему являются роды *Shigella* и *Salmonella*.

Данное семейство включает грамотрицательные, неспорообразующие, аэробные или факультативно – анаэробные прямые палочки, имеющие закругленные концы, могут быть подвижные или неподвижные. Исключениями являются р.*Shigella* и *Klebsiella*, жгутики у которых расположены по всей клетке. Некоторые представители образуют капсулы. Они, как правило, растут на простых питательных средах с бульоном из мяса, за исключением рода *Yersinia*, хорошо культивируются при 37°C. Они могут ферментировать глюкозу при муравьинокислом брожении, образуя при этом кислоту и газ, которые можно выявить при постановке реакции метиленового красного, так и 2,3-бутандиол, выявляемый при помощи реакции Фогеса-Проскауэра. Выделяют две группы бактерий по отношению к лактозе: лактозаферментирующие и лактозанаферментирующие. Кроме этого, они являются каталазаположительными, могут восстанавливать нитраты в нитриты.

Бактерии этого семейства можно дифференцировать по их основным признакам биохимической активности:

- способны образовывать газ при окислении глюкозы;
- способны расщеплять лактозу;
- продуцируют сероводород.

Так же они могут продуцировать индол, расщеплять мочевины, утилизировать цитраты, вырабатывать ферменты, образовывать аминокислоты – декарбоксилазу, лизин, орнитин, дезаминазу, фенилаланин, а также способны использовать различные моносахариды, олигосахариды и полисахариды для вырабатывания энергии [Донецкая, 2011].

Для того чтобы их классифицировать внутри рода и вида необходимо изучить их антигенную структуру. Различают О-антиген, являющийся ЛПС внешней мембраны. Однако существуют штаммы, которые лишены данного О-антигена и создают R- колонии, при этом авирулентны. Выделяют также H-антиген — термолабильные белки, имеющийся только у видов, способных к передвижению и K- антиген — термостабильные полисахариды, находящиеся в капсуле и внешней оболочке.

Вообще энтеробактерии имеют повсеместное распространение. Среди них встречаются как условно-патогенные бактерии, так и патогенные бактерии, которые вызывают различные болезни у человека, различных животных и даже растений. Например, некоторые виды родов *Escherichia*, *Salmonella*, *Shigella* могут вызвать острые кишечные инфекции (ОКИ). Патогенные иерсинии, такие как, *Y. pseudotuberculosis* и *Y. enterocolitica* способны образовать псевдотуберкулез и кишечный иерсиниоз, а *Y. pestis* – одну из самых серьезных заболеваний - чуму. Кроме этого, существуют бактерии родов *Klebsiella*, *Proteus*, *Providencia*, *Serratia* являющиеся возбудителями всевозможных внутрибольничных инфекций, среди которых вызывают еще пищевые отравления, заболевания дыхательной системы и мочевыделительного тракта [Зверева и др., 2010].

Каждый представитель энтеробактерий обладает различными факторами патогенности во всевозможных комбинациях. Эти комбинации определяют возможность развития какого-либо заболевания. Среди них выделяют:

- эндотоксин;
- пили IV типа;
- ТТСС или третий тип секреторной системы;
- белковые токсины специфического действия, к ним относятся цито- и энтеротоксины.

Не стоит забывать, что синтез факторов патогенности опосредован генами, локализованные на плазмидах, конвертирующих бактериофагах и островках патогенности [Поздеев, 2010].

Появление эндотоксина в высокой концентрации в организме способно создавать лихорадочные состояния, эндотоксический шок, развитие диареи через процесс активации каскада арахидоновой кислоты и последующего синтеза простагландинов, различные мультиорганные поражения и даже летальный исход.

Благодаря взаимодействию бактерий с поверхностным эпителием кишечника связаны первые этапы инфекционного процесса. Эти процессы создаются при помощи следующих поверхностных структур клетки: пили IV типа, филаментозные структуры, составляющие ТТСС. Пили IV типа имеются лишь у таких бактерий, как энтеротоксигенных - ЭТКП, энтеропатогенных - ЭПКП, энтероагрегативных ЭАКП кишечных палочек, и участвуют в их прикреплении к эпителиоцитам слизистой оболочки кишечника [Бондаренко и др., 2004]. Третий тип секреторной системы (ТТСС) имеет вид шприцеобразной системы белков, через которую осуществляется транспорт эффекторных молекул в цитозоль клетки, те в свою очередь индуцируют заражение бактерией клетки хозяина и развивают энтерит. Данный фактор патогенности найден у родов *Shigella*, *Salmonella*, *Yersinia*, некоторых видов *E. Coli*.

Цитотоксины имеются у рода *Shigella* и некоторых энтерогеморрагических кишечных палочках, способны вызывать нарушение клеток, понижая синтез белка. Эти токсины образуются в периплазматическом пространстве клетки при попадании после гибели микробной клетки в окружающую среду. Антифагоцитарная активность обеспечивается капсулой, Vi- антигеном у *S. Typhi*, компонентами TTCC, ферментами аденилатциклазы и супероксиддисмутазы, специфическими антигенами [Поздеев, 2010].

1.6. Pod *Escherichia*

Основным видом рода *Escherichia*, участвующий в патологии человека и животных, является *E.coli*. Данный вид был впервые описан в 1885 г. ученым Эшерихом Т.

Они являются прямыми грамотрицательными палочками небольшим размером, около 0,4-0,6х2-6 мкм. Микробы способны передвигаться при помощи жгутиков, расположенные перитрихально. При выращивании на плотных питательных средах образуют гладкие и шероховатые колонии. Колонии S-формы - они полупрозрачные и имеют блеск. В жидких средах создают некое помутнение и на дне образуют осадок. Основной средой для выращивания эшерихий является - Эндо. Бактерии, которые являются лактозоферментирующими, то они образуют ярко красные колонии с металлическим блеском, а неферментирующие виды вырастают бледно-розовыми или бесцветными колониями с более темным центром. Еще одним из основных сред является - среда Плоскирева, на ней вырастают красные с желтоватым оттенком колонии, а на среде Левина — темно - синие с металлическим блеском колонии.

Для эшерихий существуют основные биохимические свойства, которые используются для их дифференциальной диагностики при бактериологическом исследовании, являются:

- продукция кислоты и газа при ферментации глюкозы;
- ферментация лактозы;
- отсутствие продукции сероводорода;
- продукция индола [Волошина и др., 2009].

E. coli имеет сложную антигенную структуру. В частности, она обладает соматическим О-антигеном, определяющий серогруппу. В свою очередь данный антиген имеет около 171 разновидностей.

К-антиген (поверхностный) обладает тремя разновидностями: А, В и L, которые отличаются между собой чувствительностью к температуре и химическим соединениям. У эшерихий имеется более 97 разновидностей К-антигена, в частности В-типа. К-антиген также имеет способность маскировать О-антиген и вызывать так называемый феномен О-инагглютинабельности. В таком случае О-антиген возможно обнаружить при разрушении К-антигена кипячением. Н-антиген является типоспецифическим и определяет серовары, численность которых больше 57 [Донецкая, 2011].

Эшерихии могут долгое время сохраняться в воде или почве. Они неприхотливые бактерии, могут с высокой скоростью размножаться в продуктах питания, особенно молочных. Клетки можно уничтожить при нагревании при 55°C в течение 60 мин, а при 60°C - в течение 15 мин.

Вид *E. coli* может быть условно-патогенным и патогенным агентом. Но в основном эшерихии считаются облигатными представителями микрофлоры кишечника человека и других животных, влагалища – только человека. Находясь в кишечном тракте человека они выполняют немало полезных и нужных для человека функций, например:

- являются антагонистами патогенных кишечных бактерий, гнилостных бактерий и грибов рода *Candida*.

- принимают участие в синтезе витаминов группы: В, Е и К
- частично расщепляют клетчатку.

Такие микробные клетки могут считаться непатогенной флорой, хотя иногда, особенно у лиц с иммунодефицитом, при попадании в иную экологическую нишу они способны вызвать тяжелые инфекционные заболевания, протекающие в виде сепсиса, вторичной пневмонии и нагноения ран.

Патогенность эшерихии отличается от условно-патогенных возможность продукции факторов патогенности, генетически связанные с присутствием островков патогенности, конвертирующих фагов и плазмид вирулентности [Сачек и др., 2006].

В настоящее время существует еще множество мало изученных видов эшерихий. Эти кишечные палочки могут различаться по экологии, путям передачи, патогенезу и клиническим проявлениям. В свою очередь это зависит от различия в наличии или отсутствии факторов патогенности и их генетической детерминации. В каждой категории кишечных палочек имеется установленный состав О-серогрупп или О:Н-сероваров. Благодаря составу О-серогрупп и проводится первичная дифференциация диареогенных эшерихий [Зверев и др., 2010].

Таким образом, к факторам патогенности относятся:

- фимбриальные факторы (пили), которые обеспечивают адгезию к эпителию;
- белки наружной мембраны, определяющие способность бактерий прикрепляться к клеткам различных тканей;
- экзотоксины;
- термолабильный энтеротоксин LT, стимулирующий выход солей и жидкости в просвет кишечника, состоящий из двух фракций: А и В. Фрагмент В отвечает за соединение с рецептором клетки и формирование внутримембранного канала;

- термостабильный энтеротоксин ST (ST-1, ST-I1), повышающий уровень циклического гуанинмонофосфата в клетках эпителия, приводящий к нарушению выхода жидкости;
- эндотоксины — липополисахариды, определяющие антигенную специфичность бактерий,
 1. Токсин CNF — цитотоксический некротический фактор, обнаружен у EPEC — уropатогенных эшерихий.
 2. Токсин CLTD — цитолетальный разрыхляющий.
 3. Токсин EAST — термостабильный токсин, обнаружен у энтероаггративных *E. coli* [Донецкая, 2011].

ГЛАВА II. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

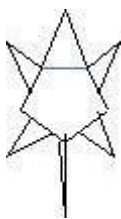
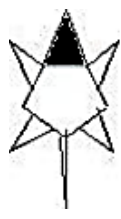
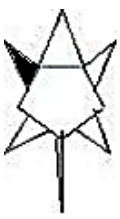
2.1. Материалы исследования

Объектом экспериментальных исследований *in vivo* явились беспородные белые мыши – самки/самцы массой 20-30 г., полученные из питомника лабораторных животных ГУП «Иммунопрепарат» г. Уфа. Животные содержались в условиях вивария ГБОУ ВПО БГМУ Минздрава России с естественным световым режимом на стандартном рационе питания лабораторных животных (ГОСТ Р50258-92) с соблюдением Международных рекомендаций Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых при экспериментальных исследованиях (1997г.), а также правил лабораторной практики при проведении доклинических исследований в РФ (ГОСТ 3 51000.3-96 и 51000.4-96). Животных распределили на группы по 12 особей для каждого эксперимента.

В работе были использованы фракции липолисахаридов *E.coli*, условно обозначенные ЛПС-1-9, ЛПС-4а, ЛПС-57-58 (выделены в НИИ биохимии и генетики УНЦ РАН г. Уфа). Препаратом сравнения с иммуномодулирующей активностью являлся липопид [Лусс Л.В. и др. Гурбанова С.Ф., 2000], который является синтетическим аналогом гликопептидов бактериальной стенки, и обладающий высокой иммуномодулирующей активностью и слабой пирогенностью. Под влиянием липоида повышается способность клеток к адгезии, к поглощению микроорганизмов, образованию активных форм кислорода, усиливается синтез различных медиаторов иммунного ответа: интерлейкина-1, фактора некроза опухоли, колониестимулирующих факторов, что, в свою очередь, оказывает стимулирующее действие на продукцию антител и пролиферацию Т- и В-лимфоцитов [Семенова И.Б., 1991].

Искусственное иммунодефицитное состояние у лабораторных животных создавали путем однократной подкожной инъекции 50 мг/кг циклофосфида (ЦФ) в форме лекарственного препарата «Циклофосфан» (ОАО «Киевмедпрепарат») за 24 часа перед введением образцов исследуемого биологического материала. Данное иммунодепрессивное средство подавляет пролиферацию участвующих в иммунном ответе лимфоцитарных клонов [Ракас І. et al., 2002].

Таблица №3.

Маркировка групп подопытных животных					
№ 1 ИНТАКТН БІЕ (ничего не вводится) Кол-во: 12	№ 2 КОНТРОЛЬ (Введение воды) Кол-во: 12	№ 3 ГР.СРАВН. (Ликопид – 0,1 мл) Кол-во: 12	№ 4 ОПЫТ (ЛПС-1) Кол-во: 12	№ 5 ОПЫТ (ЛПС-2) Кол-во: 12	№ 6 ОПЫТ (ЛПС-3) Кол-во: 12
					

2.2. Методы исследования

2.2.1. Биологические методы исследования

Для того чтобы здоровье лабораторных животных не ослаблялось, вследствие чего может повыситься риск заболеваемости инфекционными и соматическими болезнями, мы соблюдали рацион питания при кормлении, а также гигиенические мероприятия. Ведь при возникновении инфекционных процессов в организме мышей могут возникнуть

искаженные результаты эксперимента, и, следовательно, неправильные заключения.

В рацион питания мы вводили им все жизненно важные для лабораторных животных элементы, а именно белки, углеводы, жиры минеральные вещества, витамины и вода. В качестве основного питания мышам подавали зерновые культуры: овес, пшеницу, пшено, ячмень. Вместе с ними добавляли пшеничный хлеб, сухари, каши из овсянки, перловки и пшена. Не менее важным является включение в рацион моркови, яблок - антоновка и зеленых кормов, такие как, салат, шпинат. Необходимо соблюдать суточную норму хлеба, круп и овощей. Для хлеба она составляла 3-3,5 г, сочных кормов - 0,5-1 и 2-3 г, зеленых кормов, вымытых кипяченой водой и нарубленных - 2-3 и 4-6 г.

Каждый день все мышам давали поваренную соль весом 0,01 г. Из расчета на 3-4 дня в клетки клали кусок мела (1-5 г). Кормили и поили мышей два раза в сутки. Подстилкой в клетках использовали стружку или опилку из древесины. Клетки каждый день очищали и мыли горячей водой.

Перед тем, как начать эксперимент, мы мышей взвешивали, определяли их пол и измеряли температуру тела. Для того, чтобы мыши не были спутаны с другими группам, мы окрашивали различные части тела насыщенным раствором пикриновой кислоты, так как оно долго сохраняется.

Взвешивали мышей в ящиках на обычных столовых весах - Беранже.

При определении пола пользовались признаками, которые характерны для самок и самцов. По величине самцы значительно крупнее и более грубее самок, их передняя часть туловища сильнее развита, чем задняя. Для того, чтобы точно определить пол животных, мы их Для более хватали левой рукой за кожу в области шеи, а другой рукой, оттягивая при этом хвост, натягивали свободными пальцами кожу у полового отверстия. Самцов можно было отличить по расстоянию между заднепроходным и

половым отверстием, оно намного длиннее, чем у самок. Кроме этого, у самок можно заметить грудные соски.

Температуру тела у мышей измеряли обыкновенным термометром. Нормальная глубина для введения термометра считается 3,5 см. Перед введением в прямую кишку термометр обрабатывали спиртом, протирали досуха, а затем мазали на него вазелин.

Для заражения животных в диагностических лабораториях чаще всего применяют эмульсии, которые готовят из различных органов и тканей. В целях безопасности при заражении животных существуют специальные методики, которые включают в себя следующие этапы:

1. Подготовка шприцов для заражения
2. Наполнение шприцов заразным материалом
3. Заражение животных
4. Разборка шприцов после заражения
5. Обеззараживание

Перед использованием шприцов следует проверить следующие требования:

- поршень должен плотно входить в цилиндр;
- поршень не должен выпадать из него;
- поршень должен свободно двигаться в нём;
- поршень не должен пропускать набранную для контроля воду;
- цилиндр не должен иметь трещин.

При сборке шприца после обследования иглы на проходимость, определяли притёртость иглы к канюле цилиндра. Для этого шприц насухо протирали стерильной ватой, набирали воду из стерилизатора через иглу, далее эту же воду под большой силой выпускали и проверяли место насадки иглы. Отсутствие капель говорило нам о том, что шприц собран правильно, игла плотно притерта к канюле и можно использовать при работе с материалом. Наполняли шприц инфекционным материалом над ёмкостью с дезраствором. При этом надо избегать попадания в шприц

пузырьков воздуха. Введение материала с пузырьками может привести к образованию капель при извлечении иглы после заражения. Если такое случилось, то инфекционный материал надо выпустить в тампон, погружённый в дезраствор. Для дальнейшей работы используем запасной шприц.

Для фиксации мыши пускали ее по столу, придерживая мышь за кончик хвоста большим и указательным пальцами правой руки. При продвижении мыши в любом направлении, быстро схватывали ее левой рукой за складку кожи в области шеи, для того, чтобы она не могла поворачивать головой (рис. 4, а). Поднимаем мышь над столом, при этом помощник держит ее на весу одной рукой за хвост, другой—за складку кожи на затылке, растягивая в положении, удобном для экспериментатора.

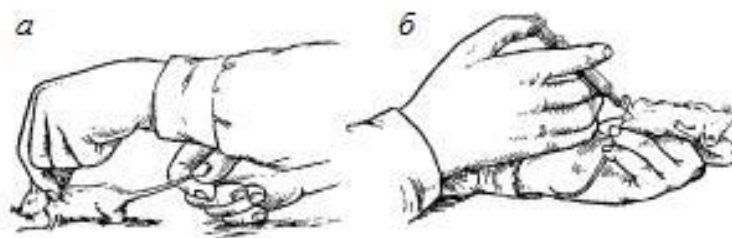


Рисунок 2. Фиксация мыши.

Если работа проводилась без помощника, то мышь закрепляли левой рукой большим и указательными пальцами левой руки хватали кожу в области шеи, а остальными пальцами придерживали хвост и кожу в области крестца (рис. 4, б). В таком случае правая рука остается свободной и ею можно проводить различные манипуляции.

Существуют различные способы заражения: внутрикожное, подкожное, внутримышечное, внутрибрюшинное, внутривенное, пероральное или интраназальное и др. Мы использовали только несколько из них:

1. Внутрибрюшинный способ заражения

Помощник держит мышь вниз головой. В таком положении кишечник смещается ближе к диафрагме, что уменьшает возможность повреждения при проколе. Держим шприц перпендикулярно к брюшной стенке, преодолевая сопротивление, осторожными движениями иглу продвигаем вглубь. При проникновении иглы в брюшную полость чувствуется так называемый «провал». После этого иглу переводим в вертикальное положение и вводим материал в полость брюшины.

2. Заражение через пищеварительный тракт

Через ротовую полость мышь можно заразить двумя способами. Первый способ, заразный материал добавляют к корму или питью животного. Данный способ самый простой и естественный, но в лабораториях им не пользуются, так как количество материала, необходимый для эксперимента, не попадает в нужном объеме.

При пероральном введении жидкостей мелким лабораторным удобнее пользоваться полихлорвиниловой трубкой, представляющей собой наружную оболочку одного провода многожильного телефонного кабеля, из которого удален проводник.

Длина данной трубки составляет 15-17 см, диаметр 1-1,5 мм. Эластический зонд даже при небольшом усилии легко проникает из полости рта в пищевод и желудок мышей, не требуя жесткого ограничения глубины введения, так как даже при излишне глубоком введении стенки желудка не повреждаются. Вводимая жидкость дозировалась с помощью шприца, на сосок которого надевали эластический зонд, внутренний просвет которого 0,5—0,7 мм.

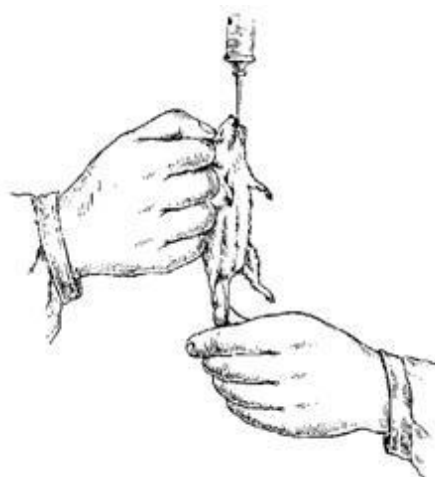


Рисунок 3. Заражение через пищеварительный тракт.

Небольшое количество крови получали у мышей из вен хвоста. В особых случаях прибегают к полному, или тотальному, обескровливанию, после которого животное погибает.

2.2.2. Экспериментальная часть *in vivo*

Модель иммунодефицита создавали путем внутрибрюшинного введения иммунодепрессивного цитостатика – циклофосфана в дозе 50 мг/кг. Подкожный способ введения препарата обеспечивал более равномерное поступление вещества в систему кровообращения и кроветворные органы, снижал скорость элиминации препарата из организма животного, что позволяло формировать длительное по времени иммунодефицитное состояние. Оптимальной является эмпирически определенная нами доза препарата 50 мг/кг, которая обеспечивала формирование достаточно выраженного и стойкого иммунодефицитного состояния и не приводила к непредсказуемой гибели части подопытных животных.

Введение липополисахаридов и препарата сравнения начинали через 24 часа после инъекции ЦФ, и далее ежедневно внутрибрюшинно в

течении 21 дня в дозе 10 пг на 1 мл (средняя доза введения липополисахаридов, применяемая в клинике).

На 22-е сутки проводили забор крови, и отобранные образцы вносили в стерильные емкости с антикоагулянтом (раствор гепарина 5000ЕД – 5мл.) для предотвращения свертывания крови.

2.2.3. Иммунологические методы исследования

2.2.3.1. Определение концентрации IgG и комплексов C1q-IgG в сыворотке крови мышей

Определение уровня иммуноглобулинов в сыворотке крови проводили методом иммуноферментного анализа (ИФА). ИФА — лабораторный иммунологический метод качественного определения и количественного измерения антигенов.

Данный анализ основан на учете реакции антиген-антитело, причем в качестве метки, позволяющей обнаружить иммунный комплекс, использовали фермент - пероксидазу хрена. В основе метода ИФА лежит принцип взаимодействия иммуносорбента — антигена возбудителя инфекции — с выявляемыми антителами и в соединении этого комплекса антиген-антитело с иммуноглобулинами, содержащим ферментную метку.

Использовали специальные 96-луночные (8 рядов по 12 лунок) планшеты из полистирола, с круглыми плоскодонными лунками вместимостью около 300 мкл.

При выполнении анализа лунки заполняли исследуемым материалом (сыворотка крови), нанося его в разные лунки с дробным разбавлением (1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32 и т.д.), после чего выдерживали около 60 мин для связывания. Если в образцах имеются антитела, комплементарные

нанесенному антигену, они образуют с ним прочные комплексы. Содержимое из лунок удаляли трехкратной промывкой буфером и, несвязавшийся материал, удалялся при промывке.

Далее лунки заполняли раствором конъюгата, представляющего собой связанные глутаровым альдегидом молекулы белка-фермента (пероксидаза хрена) и молекулы антител против антител к возбудителю. Дали время на прохождение реакции комплементарного связывания около 1 часа, после чего избыток раствора конъюгата удаляли и лунки промывали буфером. Молекулы конъюгата осаждаются на молекулах осадившихся на антигене антител из испытуемого образца. В довершение всего лунки заполняли раствором субстрата по 100 мкл, превращение которого в окрашенный продукт осуществляется конъюгированным ферментом. Такое ферментативное превращение осуществляется примерно 60 мин, после чего реакцию останавливали добавлением 5% серной кислоты. Количество превращенного субстрата пропорционально концентрации конъюгата и, следовательно, концентрации антител против возбудителя в исследуемом образце.

Кроме этого, определили долю C1q методом ИФА с помощью специфических моноклональных антител мыши. Связанные C1q с IgG выявляли с помощью поликлональных кроличьих антител против IgG мыши, конъюгированных с пероксидазой. Для приготовления субстрата использовали 0,05% раствор ОФД в 0,05 М цитратном буферном растворе, содержащем 0,01% перекиси водорода. Реакцию останавливали через 30 минут 5% серной кислотой.

Результаты учитывали на спектрофотометре "Multiskan" ("Flow", Великобритания) при длине волны 492 нм, оптическом пути 3 мм (соответствует 100 мкл раствора в лунке 96-ти луночного планшета).

2.2.3.2. Исследование поглотительной способности фагоцитов периферической крови

Исследование поглотительной способности фагоцитов периферической крови проводили на модели поглощения частиц латекса. Для оценки фагоцитоза 150 мкл крови смешивали с 50 мкл взвеси частиц монодисперсного полистерольного латекса диаметром 1,5 мкм (ПанЭко, РФ). Пробы инкубировали 30 минут в термостате при 37°C, после чего встряхивали, готовили мазки, фиксировали их смесью Никифорова и окрашивали метиленовым синим (1% раствор, разведённый 1:4) в течение одной минуты.

С помощью иммерсионной микроскопии учитывали фагоцитарный индекс (ФИ) – число поглощенных микросфер латекса в 100 подсчитанных клетках и фагоцитарное число (ФЧ) – среднее число частиц латекса на один нейтрофил (общее число фагоцитированных частиц разделить на 100)

2.2.3.3. Функциональная активность фагоцитов по показателям НСТ-теста.

Одним из инструментов изучения респираторного взрыва нейтрофилов *in vitro* является реакция восстановления ими нитросинего тетразолия (НСТ-тест). НСТ-тест может проводиться как при стимуляции нейтрофилов (индуцированный НСТ-тест), так и без нее (спонтанный НСТ-тест). В ходе реакции НСТ восстанавливается до нерастворимого диформаза, откладывающегося в клетках в виде темно-синих гранул, которые визуальным образом определяются путем микроскопирования [Виксман М.Е. и др., 1979].

В пробирки с 0,2 мл крови добавляли 0,1 мл 0,2% раствора стандартного разведенного нитросинего тетразолия в 0,1 М фосфатном буфере (рН 7,4). Для оценки индуцированного НСТ-теста в каждую лунку добавляли 20 мкл суспензии частиц монодисперсного полистерольного латекса (индуцированная серия) или 20 мкл 0,9% NaCl (спонтанная серия).

После 30-минутной инкубации при температуре 37⁰С к реакционной смеси добавляли 3 мл 0,1 % соляной кислоты для остановки реакции. Пробирки центрифугировали при 1500 об./мин в течение 5 мин. Надосадочную жидкость разлили в стерильные ампулы, из осадка приготовили мазки. После сушки препараты фиксировали этанолом и 5 минут окрашивали 0,1% водным раствором сафранина. С помощью микроскопии при использовании иммерсионной системы определяли % клеток, восстанавливающих НСТ, и интенсивность реакции по активности восстановления НСТ.

2.2.3.4. Подсчет лейкоцитарной формулы.

Лейкограмма (лейкоцитарная формула) — процентное соотношение различных видов лейкоцитов, определяемое при подсчёте их в окрашенном мазке крови.

Подсчет лейкоцитарной формулы проводят с помощью иммерсионной системы микроскопа. В связи с тем, что в мазке различные виды лейкоцитов располагаются неравномерно (моноциты и нейтрофилы — преимущественно вдоль верхнего и нижнего продольного края препарата, а лимфоциты — ближе к его центру), подсчет лейкоцитарной формулы осуществляют, пользуясь следующими методическими указаниями [Хиггинс К., 2010].

Под малым увеличением микроскопа находят край мазка крови вблизи образовавшейся щеточки. У продольного края мазка наносят каплю

иммерсионного масла, после чего фокусируют плоскость препарата. Наблюдая в окуляр, отступают на 2—3 поля зрения по направлению к середине мазка. Затем продолжают продвижение препарата в том же направлении еще на 3—5 полей зрения, в каждом из них подсчитывая имеющиеся лейкоциты. Вслед за этим продвигают мазок на 3—5 полей зрения вдоль продольного края, меняя направление продвижения мазка под прямым углом, возвращаются к краю мазка, продвигая при этом мазок еще на 3—5 полей зрения и так далее. Зигзагообразную линию, по которой продвигают мазок крови, называют линией Меандра. Подсчет продолжают до тех пор, пока не будет сосчитано 50 % клеток. Затем подсчет продолжают на противоположной стороне мазка. Так же, как описано выше, при продвижении мазка подсчитывают все лейкоциты, обнаруживаемые в поле зрения. Подсчет заканчивают, когда сумма лейкоцитов будет равна 100. В другом препарате подсчитывают еще 100 лейкоцитов.

Результаты подсчета лейкоцитарной формулы записываются в виде лейкограммы.

Таблица №4.

Показатели лейкоформулы белых лабораторных мышей
(Ронин В.С., Старобинец Г.М., 1989)

Вид животных	Базофилы	Эозинофилы	Палочкоядерные	Сегментоядерные	Лимфоциты	Моноциты
Мышь белая	0,0-2,0	0,0-4,0	1,0-5,0	13,0-30,0	60,0-78,0	2,0-5,0

ГЛАВА III. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Статистическую обработку результатов проводили непараметрическими методами с применением современных программных пакетов математико-статистического анализа. Применяли программы: «Microsoft Excel» и «Statistica 10.0», работающие в операционной среде «Windows». Отличия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Для описания количественных признаков в малых выборках применяли медиану (Me) и интерквартильный размах (Q_1 - Q_3). Для расчета статистической значимости различия количественных признаков между группами был применен непараметрический критерий Манна-Уитни для двух независимых групп.

3.1. Уровень IgG и иммунных комплексов C1q- IgG в сыворотке крови

Иммуноглобулины класса G - это наиболее распространенные из сывороточных иммуноглобулинов, обеспечивающие защиту организма от антигенов. Концентрация IgG в большей степени определяется в тканевой жидкости. Они доминируют среди других антител и имеют, играют роль в нейтрализации бактериальных токсинов, а также связывания микроорганизмов с целью их опсонизации.

В поддержании иммунного гомеостаза также ключевую роль играет система комплемента, представляющая собой комплекс белков и гликопротеидов сыворотки крови. Данный комплекс участвует в системе ответов организма, включающих анафилактические реакции, секрецию простагландинов, цитокинов, реакции свертывания крови и т.д., опсонизируя уничтожение различных клеток и микроорганизмов,

увеличивая гуморальную реакцию на антигены, и, понижая порог для В-лимфоцитарной активации [Barrington R. et al., 2001]. Инициация классического пути активации системы комплемента начинается с присоединения к активатору первого компонента комплемента – C1q, который находится в сыворотке крови в виде мультимолекулярного комплекса C1q-2C1r-2C1s, существующего в присутствии ионов кальция. В данном комплексе C1q является ответственным за связывание с активатором, которым является комплекс антиген-антитело (главным образом IgG), хотя приводить к запуску классического пути могут и реагенты клеточных стенок бактерий (липополисахариды, пептидогликаны) [Козлов Л.В., 1997].

В эксперименте в качестве препарата сравнения использовали ликопид – глюкозаминилмурамилдипептид, который представляет собой основной повторяющийся фрагмент клеточной стенки бактерий. Данный препарат был выбран благодаря своим эффектам: повышает активность лизосомальных ферментов, образование активных форм кислорода, поглощение и киллинг микробов, цитотоксические свойства по отношению к вирусинфицированным и опухолевым клеткам, экспрессию HLA-DR-антигенов, синтез цитокинов. Ликопид также способствует усилению цитотоксических свойств лимфоцитов, естественных киллеров и моноцитов, активирует фагоцитоз, стимулирует лейкопоз, оказывает противоопухолевый эффект [7].

По результатам из представленной таблицы 2, моделирование иммунодефицита у мышей вызывало угнетение как уровня иммуноглобулинов класса G , так и их комплексов C1q-IgG на 78,4% и 71,5%, соответственно.

Таблица №5.

Влияние ЛПС на уровень IgG и комплексов IgG-C1q в сыворотке крови
мышей с моделированным иммунодефицитом

Показатель	Группы мышей					
	1 (n=12)	2 (n=12)	3 (n=12)	4 (n=12)	5(n=12)	6(n=12)
	Контроль интактные	Контроль б/лечения	Ликопид	ЛПС-1	ЛПС-2	ЛПС-3
Уровень IgG, мг/мл						
M±σ	1,41±0,22	1,13±0,14	1,21±0,16	1,36±0,19	1,28±0,18	1,31±0,17
Me	1,41	1,105	1,185	1,36	1,28	1,31
[Q ₁ - Q ₃]	[1,235- 1,585]	[1,04- 1,195]	[1,155- 1,245]	[1,21- 1,505]	[1,19- 1,415]	[1,15- 1,485]
		p₁₋₂=0,003	p₂₋₃=0,106	p₂₋₄=0,006 p₃₋₄=0,04	p₂₋₅=0,02 p₃₋₅=0,18	p₂₋₆=0,024 p₃₋₆=0,2
Уровень C1q-IgG (в ед.экстинкции)						
M±σ	1,99±0,32	1,37±0,21	1,65±0,25	1,72±0,27	1,58±0,24	1,83±0,29
Me	1,98	1,415	1,57	1,71	1,58	1,78
[Q ₁ - Q ₃]	[1,78-2,12]	[1,27- 2,52]	[1,48- 1,88]	[1,55- 1,88]	[1,35- 1,68]	[1,64-2,04]
		p₁₋₂= 0,0002	p₂₋₃=0,017	p₂₋₄=0,003 p₃₋₄=0,51	p₂₋₅=0,06 p₃₋₅=0,47	p₂₋₆=0,0004 p₃₋₆=0,11

Введение животным фракций ЛПС и препарата сравнения ликопида стимулировало статистически значимое ($p<0,05$) повышение исследуемых показателей.

Уровень IgG у иммунодефицитных мышей под действием всех трех фракций ЛПС статистически значимо увеличивался на 23,1%, 15,8% и 18,6%. Повышение концентрации IgG в организме обеспечивает всестороннюю защиту от инфекции. Препарат сравнения – ликопид увеличивал содержание иммуноглобулинов на 7,2%, однако не оказывал статистически значимого действия.

Наблюдаемые статистически значимые положительные сдвиги уровня комплексов C1q-IgG в группах мышей, вводившим препарат ликопид – на 11%, ЛПС-1 – 20,8% и ЛПС -3 – 25,8% по сравнению с контрольной группой «без лечения», свидетельствуют об их стимулирующем действии на поглотительную способность иммунных клеток, в частности, нейтрофилов, а следовательно, это приводит к уничтожению связавшихся антигенов.

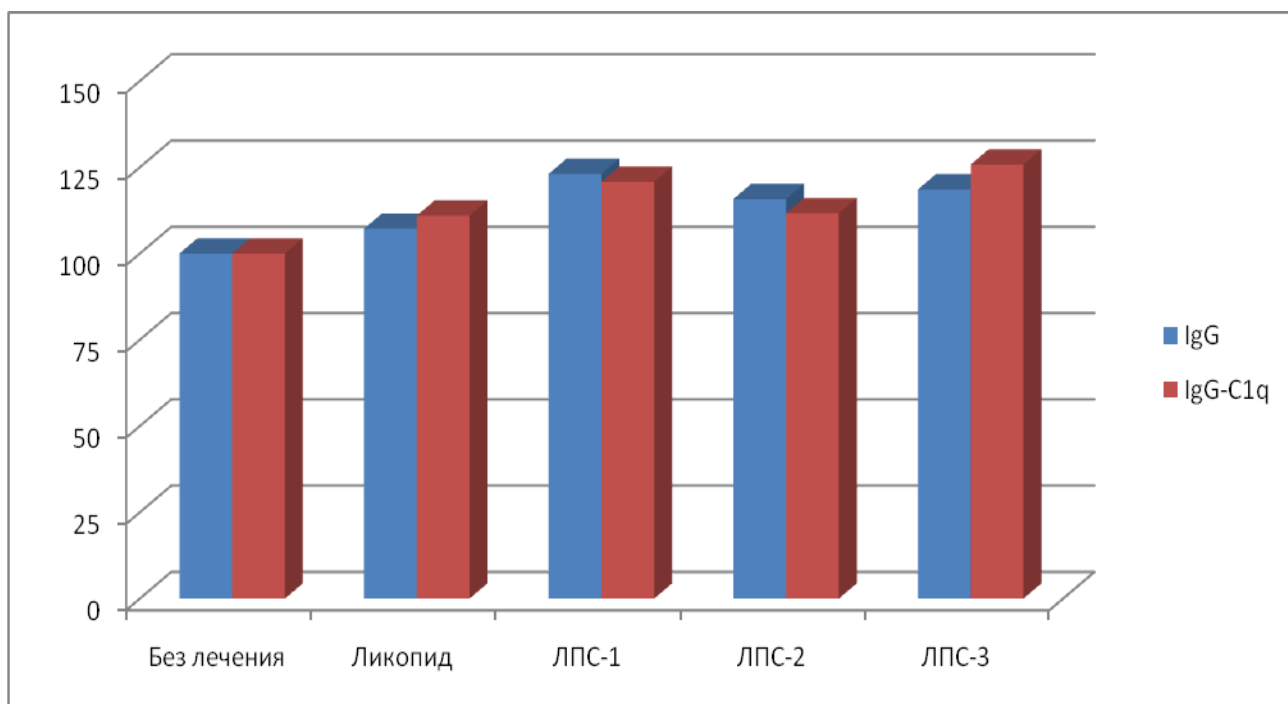


Рисунок 4. Уровень IgG и C1q-IgG в сыворотке крови мышей с моделированным иммунодефицитом.

Таким образом, применение липополисахаридов (особенно 1 и 3 фракций) способствует значимому повышению уровней IgG и их комплексов с C1q, которые снижаются под действием цитостатика циклофосфана, что свидетельствует об иммуномодулирующем действии данного препарата.

3.2. Фагоцитарная активность нейтрофилов

О фагоцитарной активности нейтрофилов судили по ФЧ – количеству захваченных частиц на один фагоцитирующий нейтрофил – и по ФИ – проценту нейтрофилов, участвующих в фагоцитозе. В качестве антигенов использовали стандартные частицы латекса. Интегральный фагоцитарный индекс рассчитывали по формуле: $ИФИ = (ФИ \times ФЧ) / 100$, где ИФИ – интегральный фагоцитирующий индекс, ФИ – фагоцитарный индекс, ФЧ – фагоцитарное число.

Как видно из представленной таблицы 2, моделирование иммунодефицита у мышей вызывало угнетение фагоцитарной активности нейтрофилов, выражавшееся в снижении исследуемых показателей: ФЧ - на 57,3%, ФИ – на 23,5%, ИФИ – на 67,2%.

Введение животным фракций ЛПС и препарата сравнения ликопида стимулировало статистически значимое ($p < 0,05$) повышение исследуемых показателей.

Таблица №6.

Влияние ЛПС на фагоцитарную активность нейтрофилов в крови мышей с моделированным иммунодефицитом

Показатель	Группы мышей					
	1 (n=12)	2 (n=12)	3 (n=12)	4 (n=12)	5(n=12)	6(n=12)
	Контроль интактные	Контроль б/лечения	Ликопид	ЛПС-1	ЛПС-2	ЛПС-3
	Фагоцитарное число					
$M \pm \sigma$ Me $[Q_1-Q_3]$	$5,4 \pm 0,109$ 5,4 [5,3-5,5]	$2,3 \pm 0,324$ 2,305 [2,15-2,6] $p_{1-2} = 0,00003$	$3,8 \pm 0,36$ 3,67 [3,5-4,15] $P_{2-3} = 0,00003$	$3,5 \pm 0,427$ 3,62 [3,15-3,95] $p_{2-4} = 0,00004$ $p_{3-4} = 0,29$	$3,2 \pm 0,183$ 3,145 [3,05-3,35] $p_{2-5} = 0,00004$ $p_{3-5} = 0,0002$	$4,2 \pm 0,31$ 4,25 [4,05-4,5] $p_{2-6} = 0,00003$ $p_{3-6} = 0,02$
	Фагоцитарный индекс					
$M \pm \sigma$ Me $[Q_1-Q_3]$	$68 \pm 5,09$ 68 [65-70,5]	$51,8 \pm 4,19$ 52 [48,5-54,5] $p_{1-2} = 0,00003$	$56,4 \pm 5,73$ 57 [51,5-59,5] $p_{2-3} = 0,035$	$57,4 \pm 4,16$ 56 [55-60] $p_{2-4} = 0,003$ $p_{3-4} = 0,6$	$56 \pm 2,398$ 56 [55,5-57] $p_{2-5} = 0,008$ $p_{3-5} = 0,73$	$57,8 \pm 3,35$ 59 [55-60,5] $p_{2-6} = 0,001$ $p_{3-6} = 0,26$
	Интегральный фагоцитирующий индекс					
$M \pm \sigma$	$3,68 \pm 0,22$	$1,18 \pm 0,15$	$2,12 \pm 2,22$	$2,02 \pm 0,22$	$1,78 \pm 0,18$	$2,42 \pm 0,04$

Показатель	Группы мышей					
	1 (n=12)	2 (n=12)	3 (n=12)	4 (n=12)	5(n=12)	6(n=12)
	Контроль интактные	Контроль б/лечения	Ликопид	ЛПС-1	ЛПС-2	ЛПС-3
Me [Q ₁ -Q ₃]	3,69 [3,53-3,88]	1,21 [1,11-1,25] p₁₋₂= 0,00003	2,04 [1,95-2,24] p₂₋₃= 0,00003	1,95 [1,83-2,24] p₂₋₄= 0,00005 p ₃₋₄ =0,19	1,84 [1,69-1,92] p₂₋₅= 0,00004 p₃₋₅ =0,0017	2,4 [2,38-2,42] p₂₋₆= 0,00003 p₃₋₆=0,004

Данные по фагоцитарной активности показаны в таблице 2 и продемонстрированы на рисунке 1. Под действием ликопида значение ФЧ возрастало на 59,2%, ФИ – на 9,6%, а ИФИ - на 68,6%, под действием фракций ЛПС-1 и ЛПС-2 на 57,1%, 7,7%, 61,2% и 36,4%, 7,7%, 52,1% соответственно. Еще более значимый эффект наблюдался при введении мышам ЛПС-3: ФЧ увеличивалось на 84,4%, ФИ - на 13,5% и ИФИ - на 98,3%.

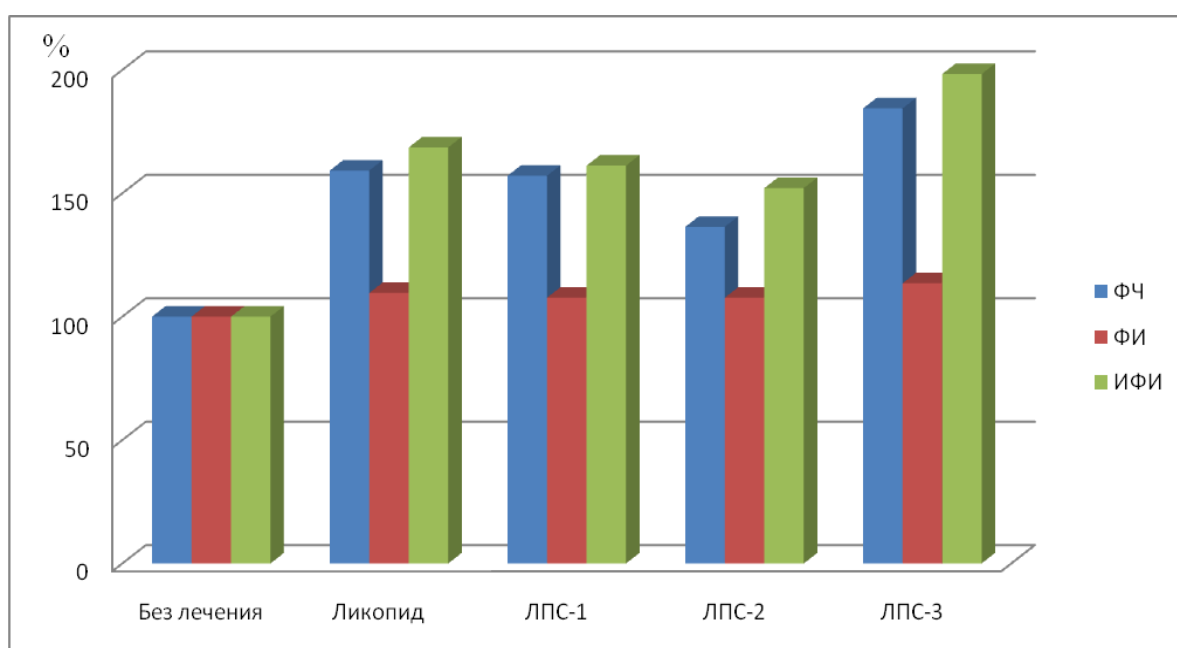


Рисунок 5. Влияние ЛПС на фагоцитарную активность нейтрофилов в крови мышей с моделированным иммунодефицитом в сравнении с контрольными группами.

Полученные в настоящем исследовании данные позволяют сделать выводы о том, что увеличение реактивности фагоцитов при лечении мышей ЛПС было связано не только с увеличением активных нейтрофилов в системном кровотоке, но и с усилением их поглотительной способности, что показывает фагоцитарное число – количество частиц латекса, захваченных одним нейтрофилом. Эти факты свидетельствуют об

усилении адгезивных свойств и рецепторной функции плазматической мембраны нейтрофилов, способности к случайной миграции, хемотаксису и поглощению инородных частиц фагоцитами в опытных группах. В сравнении с группой мышей, не получавших липополисахариды, способность нейтрофилов к фагоцитозу частиц латекса у мышей, их получавших, значительно увеличилась.

3.3. Метаболическая активность нейтрофилов по показателям НСТ-теста

Метаболическую активность нейтрофилов оценивали по их способности восстанавливать нитросиний тетразолий в спонтанном и стимулированном НСТ-тесте. В основе данного метода лежит восстановление поглощенного лейкоцитами крови растворимого красителя – нитросинего тетразолия в нерастворимый диформаза чернотелого цвета (внутриядерные включения – глыбки диформаза) под влиянием супероксиданиона, образующегося в НАДФ-оксидазной реакции, инициирующей процесс стимуляции фагоцитоза.

Моделирование иммунодефицита у мышей вызывало угнетение и метаболической активности нейтрофилов, выражавшееся в снижении исследуемых показателей: НСТ в спонтанном тесте – на 33,3%, индуцированном – на 22,7%, СЦК в спонтанном и индуцированном тестах на 29% и 27,9% соответственно, а также индекса стимуляции – на 47,4%.

Наблюдаемые статистически значимые положительные сдвиги по показателям НСТ в спонтанном и индуцированном тестах (таб.3; рис.2) в группах мышей «введение ЛПС-3» (на 40% и 28,3%) и «введение липополида» (на 30% и 16,3%) по сравнению с контрольной группой «без лечения», свидетельствуют об их стимулирующем действии на ферментативную активность и окислительно-восстановительный

потенциал клетки, а, следовательно, и способность фагоцитов справиться с бактериальной инфекцией.

Под влиянием ЛПС-1 и ЛПС 2 данные показатели хотя и зримо возрастали (на 20%, 6,5% и 10%, 4,3% соответственно), но отличия были статистически не значимы.

Таблица №7.

Влияние ЛПС на состояние функционального резерва клеток - показатели НСТ в спонтанном и индуцированном тестах

Показатель	Группы мышей					
	1 (n=12)	2 (n=12)	3 (n=12)	4 (n=12)	5(n=12)	6(n=12)
	Контроль интактные	Контроль б/лечения	Ликопид	ЛПС-1	ЛПС-2	ЛПС-3
	НСТ-СП (%)					
М±σ Me [Q ₁ - Q ₃]	7,6±1,367 7,5 [7-8,5]	5±0,847 5 [5-6] p₁₋₂= 0,0001	6,6±1,07 6,5 [6-7] P₂₋₃ =0,0015	5,4±0,656 6 [5-6] p ₂₋₄ =0,273 p₃₋₄=0,009	5,2±1,003 5,5 [5-6] p ₂₋₅ =0,622 p₃₋₅=0,005	7 ±1 7 [6-8] p₂₋₆= 0,001 p ₃₋₆ =0,6
	НСТ-ИН (%)					
М±σ Me [Q ₁ - Q ₃]	60±6,57 59,5 [55-65]	41,6±10,8 46 [34,5-51] p₁₋₂= 0,0001	54±3,79 53,5 [51,5-56] P₂₋₃=0,002	49,6±2,49 49 [48-51] p ₂₋₄ =0,126 p₃₋₄ =0,001	47,8±3,83 48 [46-50,5] p ₂₋₅ =0,371 p₃₋₅= 0,0005	58,2 ±4,49 59 [55-61,5] p₂₋₆= 0,0002 p₃₋₆=0,023

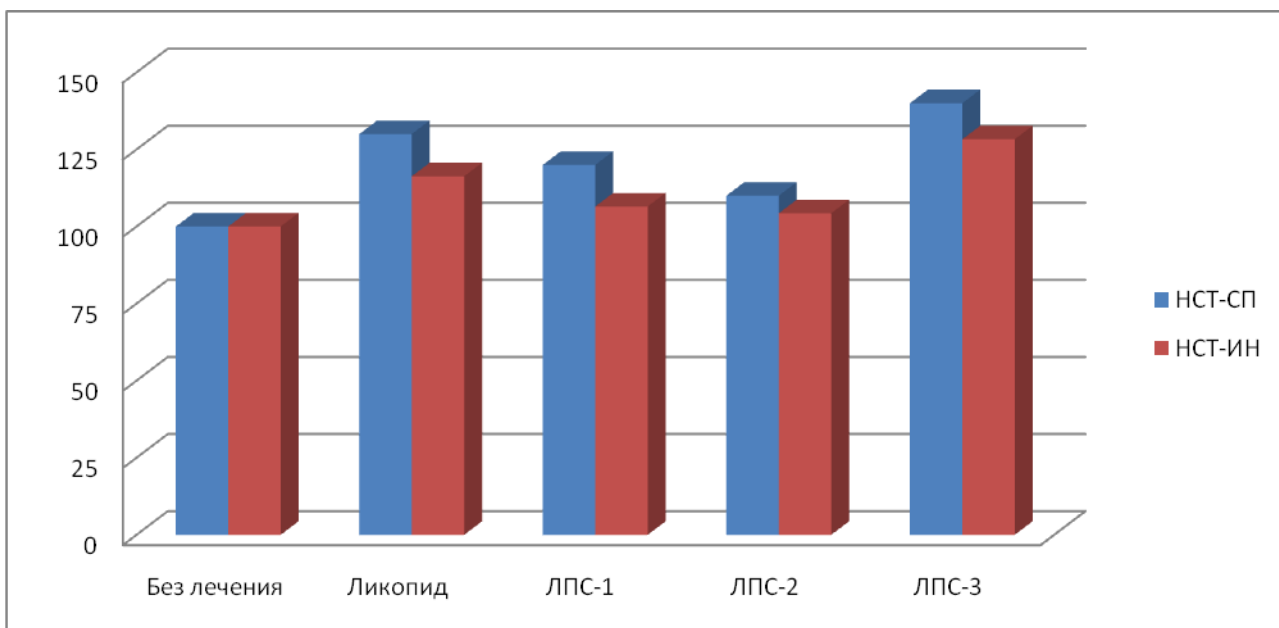


Рисунок 6. Влияние ЛПС на НСТ в спонтанном и индуцированном тестах в крови мышей с моделированным иммунодефицитом в сравнении с контрольными группами.

При постановке этого теста определяли показатель среднего цитохимического коэффициента в спонтанном тесте (СЦКСП) и показатель среднего цитохимического коэффициента в стимулированном тесте (СЦКСТ), который отображает интенсивность энергетических процессов ферментных систем фагоцитирующих клеток.

Наиболее информативным в отношении нейтрофильных резервов биоцидности является анализ динамики индекса стимуляции (ИС), рассчитанный по показателям среднего цитохимического коэффициента (таб. 4; рис. 3), отображающего интенсивность энергетических процессов ферментных систем фагоцитирующих клеток.

Введение первых двух фракций ЛПС и ликопида оказывало почти равнозначное действие. Если под действием ликопида СЦК-СП и СЦК-ИН увеличивались на 27,3% и 20,8%, то под действием фракций ЛПС-1 и ЛПС-2 - на 31,8% и 23,8%, 27,3% и 18,8% соответственно. Наибольший эффект вызывало введение ЛПС-3: значение СЦК-СП возрастало на 40,9% и СЦК-ИН – на 38,6% ($p < 0,05$).

Таблица №8.

Влияние ЛПС на индекс стимуляции по показателям спонтанного и индуцированного
среднего цитохимического коэффициента

Пока- затель	Группы мышей					
	1 (n=12)	2 (n=12)	3 (n=12)	4 (n=12)	5(n=12)	6(n=12)
	Контроль интактные	Контроль б/лечения	Ликопид	ЛПС-1	ЛПС-2	ЛПС-3
	СЦК-СП					
М±σ Me [Q ₁ -Q ₃]	0,27±0,04 0,31 [0,28-0,34]	0,2±0,03 0,22 [0,2-0,24] p₁₋₂= 0,0001	0,3±0,03 0,28 [0,27-0,31] P₂₋₃= 0,00004	0,3±0,02 0,29 [0,26-0,305] p₂₋₄= 0,0001 p ₃₋₄ =0,1	0,3±0,03 0,28 [0,27-0,305] p₂₋₅= 0,0002 p ₃₋₅ =0,6	0,31 ±0,04 0,31 [0,28-0,35] p₂₋₆= 0,00003 p ₃₋₆ =0,06
	СЦК-ИН					
М±σ Me [Q ₁ -Q ₃]	0,7±0,04 0,7 [0,68-0,72]	0,5±0,06 0,505 [0,475-0,54] p₁₋₂= 0,00003	0,61±0,04 0,61 [0,57-0,75] p₂₋₃= 0,0001	0,62±0,07 0,625 [0,56-0,66] p₂₋₄=0,004 p ₃₋₄ =0,6	0,59±0,02 0,6 [0,59-0,62] p₂₋₅=0,0001 p ₃₋₅ =0,9	0,68 ±0,03 0,7 [0,69-0,72] p₂₋₆= 0,00003 p₃₋₆=0,0003
	ИС					
М±σ	2,3±0,42	1,26±0,11	1,96±0,15	2,08±0,29	1,72±0,19	2,22 ±0,26

Показатель	Группы мышей					
	1 (n=12)	2 (n=12)	3 (n=12)	4 (n=12)	5(n=12)	6(n=12)
	Контроль интактные	Контроль б/лечения	Ликопид	ЛПС-1	ЛПС-2	ЛПС-3
Me [Q ₁ -Q ₃]	2,385 [1,98-2,605]	1,255 [1,185-1,345] p₁₋₂= 0,00003	1,97 [1,875-2,085] p₂₋₃= 0,00003	2,06 [1,905-2,35] p₂₋₄= 0,00003 p ₃₋₄ =0,27	1,725 [1,595-1,86] p₂₋₅= 0,00004 p₃₋₅=0,006	2,185 [2,01-2,43] p₂₋₆= 0,00003 p₃₋₆=0,006

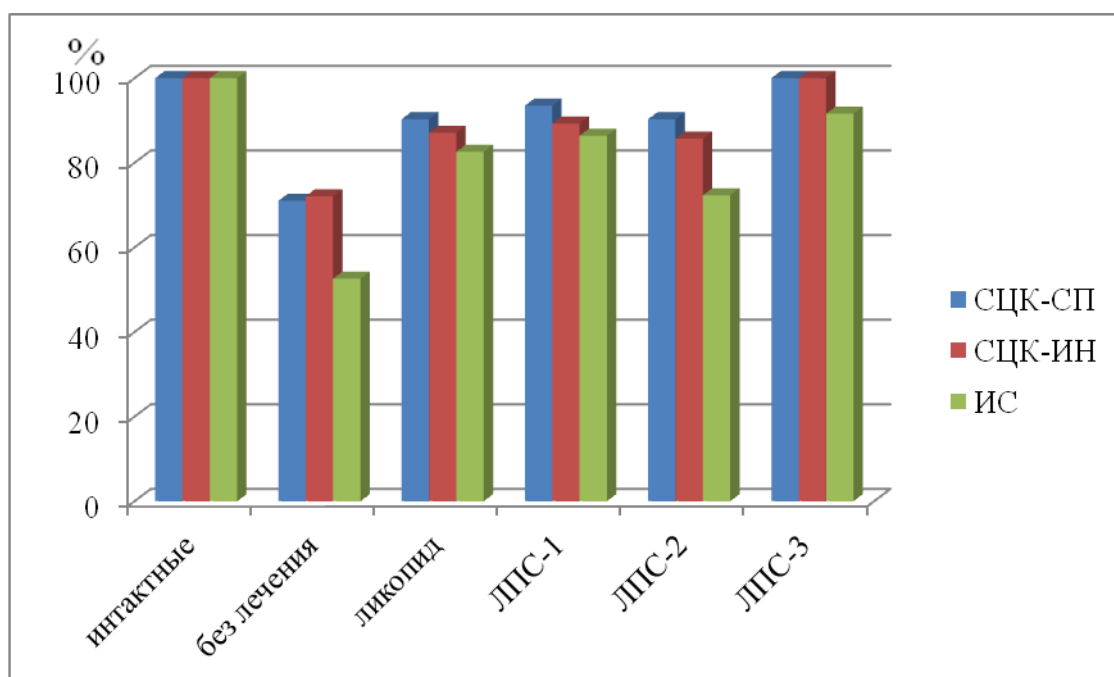


Рисунок 7. Влияние ЛПС на средний цитохимический коэффициент (спонтанный и индуцированный тесты) и индекс стимуляции в крови мышей с моделированным иммунодефицитом в сравнении с контрольными группами.

Эти данные свидетельствуют об удовлетворительном состоянии бактерицидной системы клеток, наличии их метаболического функционального потенциала и киллерной способности на фоне вторичного иммунодефицита. Таким образом, липополисахариды восстанавливают метаболическую систему фагоцитоза в нейтрофиле, повышая тем самым эффективность борьбы клеток иммунной системы.

3.4. Количественный состав форменных элементов крови

В целях сохранения вне- и внутриклеточного гомеостаза организма животных огромную роль играют лейкоциты. Они принимают участие в

обезвреживании различных токсинов, сохраняют внутреннюю среду и защищают организм от инфекционных и других генетически чужеродных для него агентов.

При введении мышам цитостатика – циклофосфана в лейкограмме наблюдались значительные изменения. Моделирование иммунодефицита вызывало статистическое значимое угнетение количественного состава всех исследуемых клеток крови, кроме эозинофилов (Э) – 50 % ($p>0,05$): базофилов (Б) уменьшилось на 50%, палочкоядерных нейтрофилов (ПН) – 42,5%, сегментоядерных нейтрофилов (СН) – 59,2%, лимфоцитов (Л) – 83%, моноцитов (М) – 40,8% ($p<0,05$). Это свидетельствует о том, что цитостатик индуцирует множественные двуцепочечные разрывы в ДНК кроветворных клеток, что приводит к мутациям, хромосомным aberrациям и, в итоге, к гибели клеток [Попова Н. А. и др., 2006].

Однако введение животным фракций ЛПС и препарата сравнения ликопида стимулировало повышение исследуемых показателей у иммунодефицитных мышей. Наблюдаются статистически значимые положительные сдвиги по количественному изменению (таб.5; рис.4):

1. Базофилов в группах мышей, вводившим фракции ЛПС-1 на – 188%, ЛПС-2 – 190%, ликопид – 252% и наибольшее увеличение наблюдалось при ЛПС-3 – 304%.
2. Эозинофилов в группах мышей «ЛПС-2», «ЛПС-3» на 231% и 210%, соответственно.
3. Палочкоядерные нейтрофилы в группах мышей «ликопид» - 64,7%, ЛПС-2 – 147,1%, ЛПС-1 – 174,1% и ЛПС-3 – 214,1%.
4. Сегментоядерные нейтрофилы в группах мышей ЛПС-1 – 86,6%, ЛПС-2 – 112%, ЛПС-3 – 139,4%.
5. Лимфоциты в группах мышей «ликопид» - 18,9%, ЛПС-2 – 22,5%, ЛПС-1 – 24,3-% и ЛПС-3 – 26,2%.
6. Моноциты в группах мышей «ликопид» - 122,1%, ЛПС-2 – 172,4%, ЛПС-1 – 235% и ЛПС-3 – 383,4%.

Под влиянием ликопида количество эозинофилов оставалось неизменным, а при введении ЛПС-1 увеличилось на 77%, но отличия были статистически не значимы. Так же количество СН у мышей, получавших препарат сравнения – ликопид, увеличивалось на 27,5%, однако данные отличия не являются статистически значимыми ($p > 0,05$).

Таблица №9.

Влияние ЛПС на количественный состав форменных элементов крови

Показатель	Группы мышей					
	1 (n=12)	2 (n=12)	3 (n=12)	4 (n=12)	5(n=12)	6(n=12)
	Контроль интактные	Контроль б/лечения	Ликопид	ЛПС-1	ЛПС-2	ЛПС-3
	Базофилы					
$M \pm \sigma$ Me $[Q_1-Q_3]$	$1,3 \pm 0,65$ 1 [1-2]	$0,5 \pm 0,58$ 0,5 [0-1] $p_{1-2} = 0,009$	$1,66 \pm 0,84$ 1,76 [1,28-2,66] $p_{2-3} = 0,0003$	$1,4 \pm 0,55$ 1,44 [0,97-1,95] $p_{2-4} = 0,002$	$1,5 \pm 0,58$ 1,45 [0,97-2,1] $p_{2-5} = 0,003$	$2 \pm 0,71$ 2,02 [1,52-2,65] $p_{2-6} = 0,0001$
	Эозинофилы					
$M \pm \sigma$ Me $[Q_1-Q_3]$	$2,3 \pm 1,07$ 2 [1,5-3]	$1,5 \pm 0,58$ 1 [1-2] $p_{1-2} = 0,07$	$1,8 \pm 0,84$ 1 [1-1,73] $p_{2-3} = 0,7$	$2,6 \pm 0,9$ 1,77 [1,33-2,16] $p_{2-4} = 0,27$	$3,25 \pm 0,5$ 3,31 [3,06-3,55] $p_{2-5} = 0,0001$	$3 \pm 0,71$ 3,1 [2,42-3,21] $p_{2-6} = 0,0002$
	Палочкоядерные					
$M \pm \sigma$ Me $[Q_1-Q_3]$	$2,2 \pm 1,11$ 2 [1-3]	$0,8 \pm 0,5$ 0,85 [0,32-0,95]	$1,4 \pm 0,55$ 1,4 [1,1-1,92]	$2,2 \pm 0,84$ 2,33 [1,57-2,84]	$2 \pm 0,82$ 2,1 [1,23-1,52]	$3,2 \pm 1,3$ 2,67 [2,12-4,35]

		p₁₋₂= 0,0003	p₂₋₃=0,004	p₂₋₄=0,0002	p₂₋₅=0,0003	p₂₋₆= 0,00004
	Сегментоядерные					
M±σ Me [Q ₁ -Q ₃]	23,7±6,51 24 [18,5-27,5]	14,8±5,19 14,2 [11,6-18,4] p₁₋₂= 0,003	18,4±3,78 18,1 [16,35-21,2] p ₂₋₃ =0,07	25,6±5,86 26,5 [21,8-28] p₂₋₄=0,0003	29,8±3,69 30,1 [27,8-32,2] p₂₋₅=0,00004	33,8 ±5,1 34 [31,34-37,3] p₂₋₆= 0,00004
	Лимфоциты					
M±σ Me [Q ₁ -Q ₃]	73,8±7,64 73,5 [69,5-80]	60,3±4,57 61 [57,9-63] p₁₋₂= 0,0004	73±8,46 72,5 [65,8-78,4] p₂₋₃=0,0003	77,4±5,55 75,8 [73,6-81,1] p₂₋₄=0,00003	74,5±7 74,7 [71,4-78,2] p₂₋₅=0,0002	77,4 ±5,41 77 [72,6-82] p₂₋₆= 0,00003
	Моноциты					
M±σ Me [Q ₁ -Q ₃]	2,1±1,08 2 [1-2,5]	0,8±0,5 0,815 [0,61-1] p₁₋₂= 0,0008	1,8±0,84 1,81 [1,4-2,03] p₂₋₃=0,001	2,6±1,52 2,73 [1,6-2,3] p₂₋₄=0,0001	2,2±0,84 2,22 [1,6-3] p₂₋₅=0,0001	3,8 ±0,84 3,94 [3-4,4] p₂₋₆= 0,00003

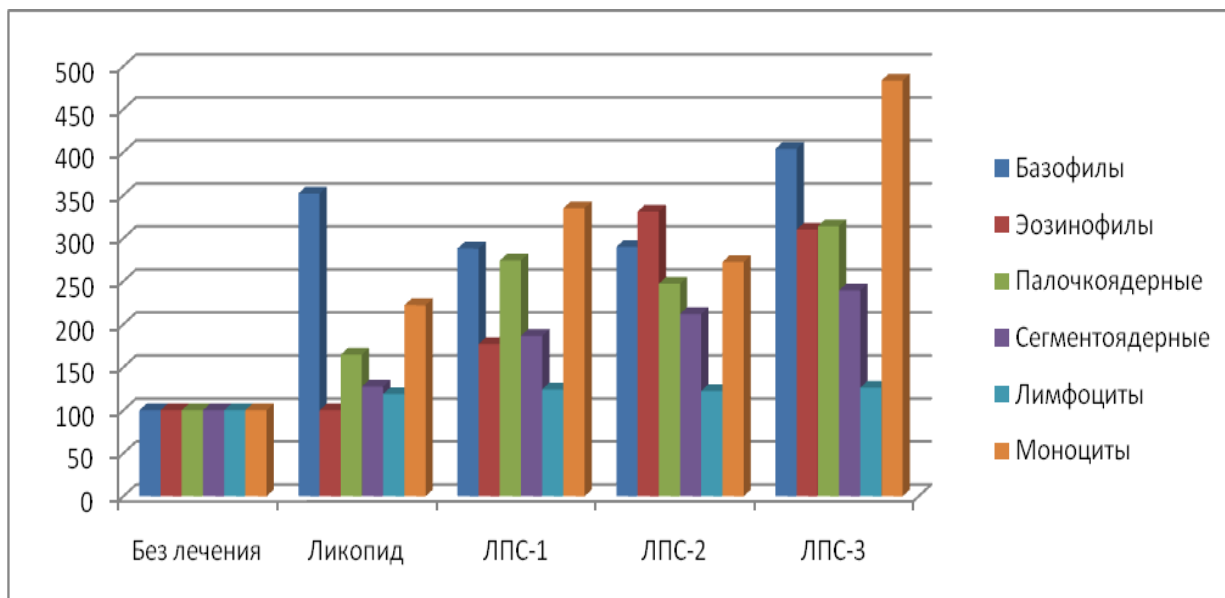


Рисунок 8. Влияние ЛПС на количественный состав форменных элементов крови.

Анализ лейкограммы при экспериментальном циклофосаниндуцированном иммунодефиците в организме мышей позволил сделать следующие выводы:

1. Иммунные нарушения в организме мышей при введении цитостатика являются результатом иммуносупрессии за счёт токсического действия на клетки крови и органы лейкопоза.
2. Введение ЛПС-3 по сравнению с другими фракциями ЛПС приводит к наиболее результативным сдвигам в количественном составе клеток крови и иммунологической реактивности организма животных.

ВЫВОДЫ

1. Липополисахариды *E.coli* оказывают иммунокорригирующее действие, восстанавливая метаболическую систему фагоцитоза, тем самым, повышая эффективность борьбы клеток иммунной системы с патогенами.
2. Наиболее эффективным иммуномодулирующим действием из трех изученных фракций ЛПС обладает ЛПС-3. Действие ЛПС-1 и ЛПС-2 сопоставимо с действием иммуностимулирующего препарата Ликопид.
3. Введение липополисахарида *E.coli* способствует повышению уровня IgG и их комплексов с субкомпонентом системы комплемента C1q, снижающегося под действием цитостатика циклофосфана, что свидетельствует о его иммуномодулирующем действии.
4. Применение препарата ЛПС вызывает положительные сдвиги в количественном составе клеток крови иммунодефицитных животных.
5. Таким образом, показанная на иммунодефицитных мышах иммуностимулирующая активность ЛПС открывает возможность продолжения данных исследований, а также дает возможность предполагать эффективность ее применения для человека

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Анаев Э. Х. «Эозинофилы и эозинофилии», НИИ пульмонологии МЗ РФ, Москва, 2003
2. Андропова Т.М. и др. // Ликопид в онкологии. Москва 2008, с.81
3. Арутюнов Г.П. Микрофлора кишечника у больных хронической сердечной недостаточностью как возможный фактор возникновения и генерализации системного воспаления [Текст] / Г.П. Арутюнов, Л.И. Кафарская, В.К. Власенко // Сердечная недостаточность. – 2003. - Т. 4, № 5. - С. 256-261.
4. Арутюнов, Г.П. Микрофлора кишечника у больных хронической сердечной недостаточностью как возможный фактор возникновения и генерализации системного воспаления / Г.П. Арутюнов, Л.И. Кафарская, В.К. Власенко // Сердечная недостаточность. – 2003. - Т. 4, № 5. - С. 256-261.
5. Беляев Д. Л., Цымбалов О. В. и др. / Эффективность цитокинотерапии лейкоинфероном при полиорганной недостаточности, гнойно септических заболеваниях и респираторном дистресс синдроме // Общая реаниматология №1, 2005
6. Быков В. Л. «Цитология и общая гистология», 2002г
Издательство: “Сотис”. - 2008 . – с. 498
7. Варбанец Л. Д., Г. М. Здоровенко, Ю. А. Книрель. Методы исследования эндотоксинов / Киев: Наук. думка, 2006. - 237 с.
8. Виксман М.Е., Маянский А.Н. Способ оценки функциональной активности нейтрофилов человека по реакции восстановления нитросинего тетразолия: Метод. рекомендации. — Казань: Казанский НИИЭМ, 1979. — 11 с

9. Галактионов, В. Г. - Иммунологический словарь : учеб. пособие для вузов по спец. 012000 "Физиология" и другим биол. спец. рек. УМО РФ / В. Г. Галактионов. - М. : Академия, 2005.
10. Галактионов В.Г. - Эволюционная иммунология. Учебное пособие: -М.: Академия, 2005.
11. Герасимов И.Г., Игнатов Д.Ю. Свертывание крови активирует нейтрофилы к респираторному взрыву // Бюл. эксперим. биол. и мед. — 2005. — Т. 140, № 7. — С. 88-90.
12. Гомоляко И.В., Силантьев В.В., Мазур А.П., Шевченко В.М., Ключкова Н.Е., Рыков О.Л. Роль функционального состояния системы нейтрофильных гранулоцитов в определении тяжести эндогенной интоксикации // Клін. хірургія. — 2003. — № 4–5. — С. 17
13. Гурбанова С. Ф. Влияние бактериальных липополисахаридов на клеточный и гуморальный иммунитет у мышей, зараженных *S. Albicans* : Проблемы медицинской микологии .; 2007.
14. Гунин. А.Г. «Гистология в таблицах и схемах. Кровь. Лейкоциты. Эозинофилы. » - 2006.
15. Джеральд М. Фаллер, Деннис Шилдс «Молекулярная биология клетки», Бином 2006г
16. Долгушин И.И., Бухарин О.В. Нейтрофилы и гомеостаз.— Екатеринбург : Изд-во УрОРАН, - 2001.
17. Дранник Г.Н. Клиническая иммунология и аллергология // М. 2003 г. с. 20 – 44
18. Егорова В. Н. Интерлейкин-2: обобщенный опыт клинического применения: юбилейное издание к 20-летию ООО «Биотех» / В. Н. Егорова, А. М. Попович, И. В. Бабаченко [и др.]. - Санкт-Петербург: Ультра Принт, 2012. - 98 с.
19. Ершов Ф. И. Пять десятилетий интерферона // Интерферону 50 лет: материалы юбилейной конференции. Москва. 2007. С. 11-35.

20. Ковалев, И.Е. Левамизол как иммуностимулятор / И.Е. Ковалев.-хим.фарм. журнал.-1980.-№4.-С.115-121.
21. Захарова И.Я., Косенко, Л.В. Методы изучения микробных полисахаридов : Наукова думка / И.Я. Захарова, Л.В. Косенко. – М.: Киев, 1982. – 192 с.
22. Караулова А.В. / Полиоксидоний в клинической практике М.: ГЭОТАР-Медиа, 2008. 136 с.
23. Климов В.В., Кологривова Е.Н., Черевенко Н.А. и др. Иммунная система и основные формы иммунопатологии - Ростов-на-Дону; Феникс. 2006. - 224 с.
24. Книрель Ю.А., Кочетков Н.К. Строение липополисахаридов грамотрицательных бактерий. I. Общая характеристика липополисахаридов и структура липида А //Биохимия.- 1993.- 58, №2.- С. 166-181.
25. Коробкова Л.И., Вельшер Л.З., Германов А.Б., Гришина Т.И., и др. Роль иммуномодулятора Галавит в онкологической и хирургической практике//Российский биотерапевтический журнал, № 2, 2004, С. 78-84/
26. Косенко Ю.В. Патогенетические механизмы взаимодействия липополисахаридов бактерий с моноцитами и лимфоцитами крови человека [Текст]: учебное пособие / Ю.В. Косенко. – М.:, 2006.
27. Лусс Л. В., Некрасов А.В., Пучкова Н.Г. и др. Роль иммуномодулирующей терапии в общеклинической практике//Иммунология. - 2000. - N5 - С.34-38.
28. Маркова Т.П., Чувиров Д.Г. Бактериальные иммуномодуляторы. РМЖ, 2001, 9 (16–17), С. 703
29. Маянский А. Н. Апоптоз нейтрофилов / А. Н. Маянский, Н. А. Маянский, М. И. Заславская и др. // Иммунология. 1999. -№ 6. - С. 11-20
30. Меджитов Р., Джаневей Ч. / Врожденный иммунитет // Казанский медицинский журнал №3, 2004

31. Мейл Д., Бростофф Дж., Рот Д.Б., Ройтт А. Иммунология М.: Логосфера, 2007, 568 с
32. Назаренко Г. И. , Кишкун А. А. Клиническая оценка результатов лабораторный исследований, Москва, 2005.
33. Оноприенко Н. Н., Павлович, Н. В. Взаимодействие S-и R-липополисахаридов *francisella tularensis* с липополисахаридсвязывающим белком сыворотки крови человека: журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии / Н. Н. Оноприенко, Н. В. Павлович. – М.:, 2008 . – 16-21 с
34. Павлова И.Н., Конопацкова О.М., Пшеничная Е.И. / Иммунологические показатели у больных раком молочной железы при включении в схему комбинированного лечения нуклеината натрия // Медицинский альманах №3, 2009. с.96
35. Павлович С. А. «Микробиология с вирусологией и иммунологией: учебное пособие», Мн.: Выш. шк., 2005, 799с
36. Пак, С.Г. Гуморальные и клеточные адаптационные механизмы при развитии интоксикационного синдрома у больных острыми вирусными гепатитами / С.Г. Пак, Е.В. Волчкова, К.Т. Умбетова // Терапевтический архив - 2004. – №11, с.61-65
37. Пашенков М.В., Пинегин Б.В. Физиология клеток врожденной иммунной системы: дендритные клетки // Иммунология 2006 г. №6 с. 368 – 373
38. Пинегин Б.В., Карсанова М.И. Макрофаги : свойства и функции // Иммунология 2009 г. , №6 с. 241 - 242, 246 - 247.
39. Плехова Н.Г. Бактерицидная активность фагоцитов // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. - 2006. - №6. - С. 89-96
40. Попова Н. А. и др. Влияние экзогенной ДНК на восстановление лейкопоза и противоопухолевый эффект циклофосфана // Вопросы онкологии. - 2006.-N 3.-С.336-340

41. Ройт А., Бростофф Дж., Мейл Д. Иммунология. Пер. с англ. - М.: Мир, 2000.-592 с.
42. Руднов, В.А. Септический шок: современное состояние проблемы / В.А. Руднов //Инфекции и антимикробная терапия. - 2003. – №3, с. 68-75
43. Рябиченко, Е.В. Молекулярные аспекты повреждающего действия бактериальных липополисахаридов / Е.В. Рябиченко, Л.Г. Веткова, В.М. Бондаренко // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии - 2004. - №3, с.98-105
44. Рябиченко, Е.В. Цитокинстимулирующая активность липополисахарида грамотрицательных бактерий и его роль в противоопухолевом иммунитете [Текст] / Е.В. Рябиченко, В.М. Бондаренко, Л.Г. Веткова // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. - 2005. - № 6. - С. 76-81.
45. Семенова И.Б., Акатов А.К. Бактериальные экзотоксины и анатоксины как антигеннеспецифические иммуномодуляторы // Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 1991. -№ 12. - С. 69 – 73
46. Сибиряк С.В., Алехин Е.К. Иммуотропные свойства липополисахаридов грамотрицательных бактерий // Антибиотики и химиотер. - 1988. -т.33, №11. С. 871 – 877
47. Улумбеков Г. Э., «Гистология, эмбриология, цитология», Издательство. ГЭОТАР-МЕД, 3-е издание. 2007, - с.405
48. Хаитов Р.М. Иммуномодуляторы механизм действия и клиническое применение/РМ Хаитов. Б.В Пинегин//Иммунология - 2003 - N4 - С.196-203.
49. Харланова, Н.Г. Роль медиаторных факторов в патогенезе почечной недостаточности при эндотоксемии [Текст] / Н.Г. Харланова, Ю.М Ломов, Э.А. Бардахчян // Эпидемиология и инфекционные болезни. - 2004. - № 6. - С. 49-52.

50. Хиггинс К. Анализы и расшифровка // перевод с англ. 2010г. с. 61- 67.
51. Ченцов Ю. С «Введение в клеточную биологию» Москва, ИКЦ «Академкнига» 2004г
52. Шевцова З.В. Иммунология. Учебное пособие // Сухум 2008г. с. 25-27
53. Яковлев М.Ю. Элементы эндотоксиновой теории физиологии и патологии человека / М.Ю. Яковлев // Физиология человека. - 2003. - Т. 29, № 4. - С. 98-109
54. Ярилин А.А. «Иммунология: учебник», М.: ГЭОТАР-Медиа, 2010, 742с.
55. Akira S. Toll-like receptors signaling. J. Biol. Chem., 2003, v.278, no.40, p. 38105-38108.
56. Auffray C, Sieweke MH, Geissmann F. Blood monocytes: development, heterogeneity, and relationship with dendritic cells. Annu. Rev. Immunol 2009
57. Beutler B.A. TLRs and innate immunity. Blood, 2009, v.113, p.1399–1407.
58. Bohm M., Richter J., Kelsen S. et al. Esophageal dilation: simple and effective treatment for adults with eosinophilic esophagitis and esophageal rings and narrowing // Dis. Esophagus. – 2010. – Vol. 23. – P. 377–385.
59. Bosshart H., Heinzelmann M. Targeting bacterial endotoxin: two sides of a coin. Ann. NY Acad. Sci., 2007, v.1096, p.1-17.
60. Brade H. et al., Endotoxin in Health and Disease. 1999
61. Bryant C.E., Spring D.R., Gangloff M., Gay N.J. The molecular basis of the host response to lipopolysaccharide. Nat. Rev. Microbiol., 2010, v.8, p.8-14.
62. Bruce Alberts, Alexander Johnson, Julian Lewis, Martin Raff, Keith Roberts, Peter Walter «Molecular Biology of the Cell», 2008.

63. Cahot E., Libon C., Kernels S., et al. Translocation of ribosomal immuno-stimulant through an in vitro-reconstituted digestive barrier containing M-like cells. *Scand. J. Immunol.* 2000
64. Dinarello C.A. *Fever 11 Interleukin-1, inflammation and disease* / Eds. Bomford R., Henderson B. North-Holland Publishing Co., Amsterdam: Elsevier, 1989.-P. 175-190.
65. Falcone F. H., Zillikens D., Gibbs B. F. The 21st century renaissance of the basophil? Current insights into its role in allergic responses and innate immunity // *Exp dermatol.* – 2006. – V. 15. № 11. – P. 855–864.
66. Fujihara M., Muroi M., Tanamoto K., Suzuki T., Azuma H., Ikeda H.. Molecular mechanisms of macrophage activation and deactivation by lipopolysaccharide: Roles of the receptor complex. *Pharmacology and Therapeutics* . 2003; 100: 171–94.
67. Galanos C., Lehman V., Luderitz O. et al. Endotoxic properties of chemically synthesized lipid A precursor and synthetic analogues with biosynthetic lipid A precursor and free lipid A // *Eur. J. Biochem.* 1984. - Vol. 140. -P. 221 -227.
68. Geissmann F., Jung S., Littman DR. Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. *Immunity* 2003
69. Janeway C.A. Jr., Medzhitov R. Innate immune recognition. *Annu. Rev. Immunol.*, 2002, v.20, p.197-216.
70. Jerala R. Structural biology of the LPS recognition. *Intern. J. Med. Microbiol.*, 2007, v.297, p.353-363.
71. Kupper T.S., Fuhlbrigge R.C. Immune surveillance in the skin: mechanisms and clinical consequences // *Nature reviews*. 2004. Vol. 4. P. 211—22.

72. Leon C.G., Tory R., Jia J., Sivak O., Wasan K.M. Discovery and development of Toll-like receptor 4 (TLR4) antagonists: a new paradigm for treating sepsis and other disease. *Pharm. Res.*, 2008, v.25, no.8, p.1751-1761.
73. Loppnow H., Libby P., Ereudenberg M. et al. Cytokine induction by lipopolysaccharide (LPS) corresponds to lethal toxicity and is inhibited by nontoxic *Rhodobacter capsulatus* LPS // *Infect. Immun.* - 1990. - Vol. 58, №11. - P.3743-3750
74. Loppnow H., Steltler P., Schonbeck U. et al. Endotoxin activates human vascular smooth muscle cells despite lack of expression of CD14 mRNA or endogenous membrane CD14 // *Infect. Immun.* - 1995. - Vol. 63, № 3. - P, 1020-1026.
75. Matsushima N., Lee H., Yoo O.J., Lee J.O. Crystal structure of the TLR4-MD-2 complex with bound endotoxin antagonist Eritoran. *Cell*, 2007, v.130, p.906–917.
76. Medzhitov R., Preston-Hurlburt, P., Janeway, C.A., Jr. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature*, 1997, v.388, p.394–397.
77. Miyake K. Roles for accessory molecules in microbial recognition by Toll-like receptors. *J. Endotoxin Res.*, 2006, v.12, p.195–204.
78. Pakas I., Ioannidis J.P., Malagari K. et al. Cyclophosphamide with low or high dose prednisolone for systemic sclerosis lung disease. *J Rheumatol* 2002
79. Poltorak A., He X., Smirnova I., Liu M.Y., Van Huffel C., Du X., Birdwell D., Alejos E., Silva M., Galanos C., Freudenberg M., Ricciardi-Castagnoli P., Layton B., Beutler B. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in *Tlr4* gene. *Science*, 1998, v.282, p.2085–2088.
80. Shizuo A. Toll-like receptor signaling. *J. Biol. Chem.*, 2003, v.278, no.40, p.38105-38108.

81. Tapping R.I., Akashi S., Miyake K., Godowski P.J., Tobias P.S. Toll-like receptor 4, but not Toll-like receptor 2, is a signaling receptor for *Escherichia* and *Salmonella* lipopolysaccharides. J. Immunol., 2000, v.165, p.5780–5787.

82. Yoshimoto T. Basophils as Th2-inducing antigen - presenting cells// International immunology. – 2010. –V. 22. № 7. – P. 543—550.

ПРИЛОЖЕНИЕ

Информация о документе:

Имя исходного файла: Габдрахманова А.Р. МБ-401 A.doc

Имя компании: Башкирский государственный медицинский университет

Тип документа: Прочее

Имя документа: диплом_Габдрахманова

Дата проверки: 23.06.2016 12:53

Модули поиска: Диссертации и авторефераты РГБ, Модуль поиска ЭБС "Лань", Интернет (Антиплагиат), Башкирский государственный медицинский университет, Кольцо вузов

Текстовые статистики:

Индекс читаемости: сложный

Неизвестные слова: в пределах нормы

Макс. длина слова: в пределах нормы

Большие слова: в пределах нормы

Оригинальные блоки: 83.76%

Заимствованные блоки: 16.24%

Заимствование из "белых" источников: 0%

Итоговая оценка оригинальности: **83.76%**



Отзыв научного руководителя
о прохождении дипломной практики
студентки 4 курса обучения
медико-профилактического факультета с отделением микробиологии
ГБОУ ВПО БГМУ Минздрава России
Габдрахмановой Азалии Ранисовны по теме:
«ИССЛЕДОВАНИЕ ИММУНОДУЛИРУЮЩИХ ЭФФЕКТОВ
ЛИПОПОЛИСАХАРИДА ИЗ КЛЕТОЧНОЙ СТЕНКИ *E. COLI*
В ЭКСПЕРИМЕНТЕ»

Студентка Габдрахманова А.Р. проходила дипломную практику в Башкирском государственном медицинском университете на кафедрах биологической химии, фундаментальной и прикладной микробиологии.

В процессе подготовки и написания работы студентка проявила отличные навыки в работе с теоретическими источниками и практической работой. За время прохождения практики проявила себя ответственным, дисциплинированным, инициативным экспериментатором.

В ходе выполнения дипломной работы Габдрахманова А.Р. изучила большой объем отечественной и зарубежной научной литературы по данной теме и успешно овладела основными иммунохимическими, иммунологическими, микробиологическими методами исследования, а также освоила работу с лабораторными животными. Кроме этого, студентка хорошо изучила методы статистической обработки результатов исследования.

Результаты дипломной практики Габдрахмановой А.Р. заслуживают отличной оценки.

Научный руководитель:

д.б.н., профессор

кафедры биологической химии

Рисун

О.А. Князева

РЕЦЕНЗИЯ

на дипломную работу студентки 4 курса обучения
медико-профилактического факультета с отделением микробиологии
ГБОУ ВПО БГМУ Минздрава России
Габрахмановой Азалии Ранисовны.

На рецензию представлена дипломная работа на тему «Исследование иммунодулирующих эффектов липополисахарида из клеточной стенки *E.coli* в эксперименте».

Данная тема является актуальной по сей день, поскольку биологический эффект липополисахаридов разнообразен и механизм действия различных фракций ЛПС на иммунную систему мало изучен.

Оформление работы полностью соответствует принятым стандартам и соответствует традиционной схеме. Объем составляет 119 страниц, из них 36 страниц приложение, библиографический список включает 82 источника, среди которых 30 на иностранном языке.

В первой главе дипломной работы автором достаточно подробно изучены все этапы иммунной защиты, виды иммуномодуляторов, которые используются в клинике различных заболеваний, структура липополисахаридов *E.coli* и их иммунобиологические свойства, а также строение бактериальной клетки, в частности бактерий рода *Escherichia*.

Вторая глава посвящена описанию материала и методов, применяемых в ходе эксперимента. Используются иммунологические и иммунохимические методы исследования, которые являются одними из главными в клинической лабораторной диагностике на сегодняшний день. К ним относятся: определение фагоцитарной и метаболической активности макрофагальных клеток, уровня иммуноглобулинов G и их комплексов с субкомпонентом первого фактора компонента комплемента - C1q, а также количественный учет состава форменных элементов крови и составление лейкоцитарной

формулы.

В третьей главе приводятся результаты проведенных методов исследования, их статистическая обработка и общие итоги проведенной работы. Выводы являются научно обоснованными и практически реализуемыми.

В целом дипломная работа Габдрахмановой А.Р. написана грамотно, с должным профессиональным подходом и выполнена в соответствии с предъявляемыми требованиями, может быть допущена к защите и заслуживает отличной оценки.

д.м.н., профессор, декан
медико-профилактического
факультета с отделением
микробиологии



Ш.Н. Галимов



РЕЦЕНЗИЯ

на дипломную работу студентки 4 курса обучения
медико-профилактического факультета с отделением микробиологии
ГБОУ ВПО БГМУ Минздрава России
Габрахмановой Азалии Ранисовны.

На рецензию представлена дипломная работа на тему «Исследование иммунодулирующих эффектов липополисахарида из клеточной стенки *E.coli* в эксперименте».

Тема достаточно полно изучена и раскрыта с изложением собственной позиции, обобщением отечественного и зарубежного опыта. Библиографический список включает в себя 82 источника, из них 30 на иностранном языке.

Работа включает такие разделы, как введение, литературный обзор, описание материалов и методов исследований, представление собственных результатов и их обсуждения, заключение, выводы, список использованной литературы, приложения. Кроме этого, в работе ясно показана актуальность, научная новизна и практическая значимость результатов эксперимента.

В главах, посвященных результатам исследования, подробно изложены основные итоги проведенной работы. Сформулированные выводы автора обоснованы, достоверны и могут быть использованы в практической деятельности. Материал работы логически структурирован, написан научным стилем изложения.

Дипломная работа Габдрахмановой А.Р. удовлетворяет всем требованиям, предъявляемым к выпускным квалификационным работам, может быть рекомендована к защите и заслуживает оценки «отлично».

Д.б.н., зав.лабораторией
молекулярной фармакологии и иммунологии
ИБГ УНЦ РАН

Ю.В. Вахитова

