

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«БАШКИРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

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

На правах рукописи

Сафин Рамиль Шамилевич

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ОЦЕНКА ИММУНОМОДУЛИРУЮЩЕЙ
АКТИВНОСТИ ЛИПОПОЛИСАХАРИДОВ БАКТЕРИИ РОДА
PSEUDOMONAS AERUGINOSA

Научный руководитель:

доктор медицинских наук,
профессор



А.Р. Мавзютов

Уфа – 2018

СОДЕРЖАНИЕ

Перечень условных обозначений (сокращений)	3
ВВЕДЕНИЕ	4
ГЛАВА I. Обзор литературы	8
1.1. Структура и биологическая роль липополисахаридов бактерий.	8
1.2. Применение липополисахаридов в медицине	13
1.3. Характеристика бактерии <i>Pseudomonas aeruginosa</i> и их значение	19
1.4. Иммунодефициты и их коррекция	20
1.5. Количественный состав форменных элементов крови	
ГЛАВА II. Материалы и методы	26
2.1. Материалы исследований	26
2.1.1. Лабораторные животные	26
2.1.2. Препарат создания модели иммунодефицита	27
2.1.3. Препарат группы сравнения	30
2.1.4. Фракции липополисахаридов <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	31
2.2. Методы исследований	31
2.2.1. Расчет органомерических характеристик паренхиматозных органов	31
2.2.2. Подсчет лейкоцитарной формулы	
2.2.3. Статистическая обработка	34
ГЛАВА III. Результаты и обсуждение	36
3.1. Анализ органомерических характеристик органов при иммунодефиците и на фоне применения фракций ЛПС <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	38
3.2. Анализ количественного состава форменных элементов крови при иммунодефиците и на фоне применения фракций липополисахаридов <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	42
ВЫВОДЫ	44
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ	47

Перечень условных обозначений (сокращений)

ГМДП- глюкозаминилмурамилдипептид

ДДС- додецилсульфата

ЖКТ- желудочно-кишечный тракт

КДО-2-кето-3-дезоксиктоновую кислоту

ЛПБК- ЛПС-белковые комплексы

ЛПС – липополисахарид

МК- массовый коэффициент

О-ПС- О-специфический полисахарид

СКВ- системная красная волчанка

ЦНС- центральная нервная система

ЦФ-циклофосфан

ЭДТА- этилендиаминтетрауксусная кислота

l-ДОФА- l-3,4-диокси-фенилаланин

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность исследования. Проблема инфекционных патологий по сей день занимает значительное место в структуре заболеваемости и смертности всего человечества. Из года в год появляются новые инфекции, кроме этого, активируются ранее известные болезни – туберкулез, гепатиты, малярия (Онищенко Г.Г., Кутырев В.В., Кривуля С.Д., Федоров Ю.М., Топорков В.П. Стратегия борьбы с инфекционными болезнями и санитарная охрана территорий в современных условиях. Пробл. особо опасных инф. 2006; 92(2):5–9). На фоне большого, неограниченного, бесконтрольного и массового приема антибактериальных, противогрибковых, противовирусных и других химиотерапевтических препаратов наблюдается ярко выраженное снижение иммунореактивности организма и, соответственно, снижение его защитных свойств. В связи с этим резко возрос интерес современной медицинской и биологической наук в разработке и применении препаратов, воздействующих на иммунитет больных с заболеваниями, которые характеризуются вялым, рецидивирующим течением с устойчивостью к адекватной этиотропной терапии (Соловьева Т.Ф., Оводов Ю.С., 2003).

В клинической практике для восстановления иммунитета, после перенесенного хронического заболевания любой этиологии принято использовать иммуномодуляторы. В настоящее время на фармацевтическом рынке в России существует большое число различного происхождения иммуномодуляторов. Однако иммунокорректоры из бактериальных липополисахаридов грамотрицательных бактерий разрабатываются и применяются достаточно редко, несмотря на то, что их эффективность все чаще обсуждается и научно доказывается.

Липополисахариды (ЛПС) – это полифункциональный компонент наружной мембраны всех грамотрицательных бактерий, который отвечает за многие иммунологические и патогенетические особенности течения

инфекционного процесса (Гурбанова С. Ф. Влияние бактериальных липополисахаридов на клеточный и гуморальный иммунитет у мышей, зараженных *C. Albicans* : Проблемы медицинской микологии .; 2007.). Довольно обширный спектр биологических свойств ЛПС объясняет большое внимание клиницистов и экспериментаторов к данному макромолекулярному компоненту микробной клетки (Сибиряк С.В., Алехин Е.К., 2008).

На рынке существует большое количество лекарственных средств, воздействующих на иммунную систему. К примеру, к иммуномодуляторам микробного происхождения относят: ИРС-19, рибомунил, анатоксин стафилококковый очищенный (АСО) и многие другие. Они представляют собой лизаты бактерий и/или рибосомально-протеогликановые комплексы и обладают стимулирующим действием на специфический и неспецифический иммунитет. Касательно ЛПС полагают, что они преимущественно являются поликлональными стимуляторами В-лимфоцитов и индукторами интерферонов и могут использоваться как их индукторы (Куркин, Д.В., Арчакова, Ю.В., Волотова, Е.В., Бородкина, Л.Е. Иммуотропные препараты: Клинико-фармацевтические аспекты применения методическое пособие / Д.В. Куркин, Ю.В. Арчакова, Е.В. Волотова, Л.Е. Бородкина. – М.: ВолгГМУ, 2013. – 72 с.).

Таким образом, обзор литературных и научных источников показывает нам наиважнейшее значение использования ЛПС бактериологического происхождения в качестве иммуномодуляторов, однако экспериментальное использование ЛПС бактерии *Ps. aeruginosa* практически не изучено, что определяет актуальность наших исследований.

Цель исследования. Изучение иммуномодулирующих свойств очищенных липополисахаридов бактерии *Pseudomonas aeruginosa* в эксперименте на фоне иммунодефицитных лабораторных животных.

Задачи исследования.

1. Индуцировать иммунодефицит у лабораторных мышей путем введения цитостатика – циклофосфана.
2. Охарактеризовать изменения органомерических характеристик паренхиматозных органов (печень, почки, селезенка) и сердца лабораторных мышей после терапии фракций липополисахаридов бактерии *Pseudomonas aeruginosa* на фоне иммунодефицита.
3. Установить влияние липополисахарида *Pseudomonas aeruginosa* на количественный состав форменных элементов крови (лейкоцитов, эозинофилов, палочкоядерных и сегментоядерных нейтрофилов, моноцитов) и значение лейкоцитарного индекса.

Научная новизна и теоретическая ценность работы. Новизна исследования заключается в изучении иммуномодулирующих свойств липополисахаридов бактерии *Pseudomonas aeruginosa* при экспериментальном иммунодефиците лабораторных мышей – их влияния на изменения органомерических характеристик паренхиматозных органов, а также на количественный состав форменных элементов крови.

Научно-практическая значимость. Работа представляет научно-практический интерес, который заключается в изучении иммуномодулирующих свойств ЛПС бактерии *Pseudomonas aeruginosa*. Полученные в результате работы данные могут быть использованы в разработке новых безопасных иммуномодулирующих препаратов.

ГЛАВА I. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Структура и биологическая роль липополисахаридов бактерий

Липополисахарид (ЛПС) — это сложный комплекс, который образуется в стенке грамотрицательных бактерий из липидов и углеводов. До недавнего времени наиболее подробно был изучен и охарактеризован ЛПС *P. aeruginosa* (Meadow P. M. Wall and membrane structures on the genus *Pseudomonas* // Genetics and biochemistry of *Pseudomonas* / Ed. R. Clarke. — London; New York : John Wiley and sons, 1975.— P. 67—98.); информация о строении ЛПС других видов рода *Pseudomonas* изучены недостаточно полно. Строение ЛПС *P. aeruginosa* аналогична структуре ЛПС прочих грамотрицательных бактерий и включает в себя липид А (базовая структура), центральный олигосахарид и О-специфические боковые цепи (Егорова О.Н., Брусина Е.Б, Григорьев Е.В. «Эпидемиология и профилактика синегнойной инфекции» 11.2014). Отличительной особенностью ЛПС некоторых представителей рода *Pseudomonas* (*P. aeruginosa*, *P. alcaligenes*) является относительно высокое содержание фосфора. По данным Вилкинсона (Wilkinson S. G. Cell walls of *Pseudomonas* species sensitive to ethylenediaminetetraacetic acid // J. Bacteriol. — 1970. — 104, N 3. — P. 1035— 1044.), существует взаимозависимость между наличием высокого содержания фосфора в наружной мембране и чувствительностью к этилендиаминтетрауксусной кислоте (ЭДТА). Металлсвязывающие свойства конденсированных фосфатов позволяют присоединить ЛПС через ионные мостики к другим различным компонентам клеточной оболочки. Добавление ЭДТА разрывает эти связи и вызывает лизис бактерий (Gray G. W., Wilkinson S. G. The action of ethylenediaminetetraacetic acid on cell walls of some gram-negative bacteria // J. Gen. Microbiol. — 1965. — 39, N 3. — P. 385—399., Wilkinson S. G. The sensitivity of *pseudomonads* to ethylenediaminetetraacetic acid, // J. Gen. Microbiol. — 1967. — 47, N 1. —

Р. 67—76.). ЛПС имеет свойства эндотоксина, которые выражаются антигенными свойствами (О-антиген).

Несмотря на небольшие структурные варианты, липид А — «консервативная» часть молекулы ЛПС, она меньше всего изменялась в процессе эволюции грамотрицательных бактерий, также имеет схожее строение со многими видами микроорганизмов. Как показали научные работы последних лет (Weckesser P., Mayer H. Different lipid types in LPS of phototrophic and related nonphototrophic bacteria 11 FEMS Microbiol. Revs. — 1988. — 54, N 1. — Р. 143—154), у грамотрицательных бактерий встречаются только два основных вида структурно-пространственной организации липида А; оба они были обнаружены у бактерий рода *Pseudomonas*. Более распространенным видом организации, который свойственен, в частности, и *P. aeruginosa* (Drewry D. T., Lomax Y. A., Gray G. W., Wilkinson S. G. Studies of lipid A fractions from the lipopolysaccharides of *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas alcaligenes* // Biochem. J.— 1973.— 133, N 3.— Р. 563—572, Luderitz O., Freudenberg M. A., Galanos C. et al. Lipopolysaccharides of gram -negative bacteria // Membrane lipids of procaryotes / Ed. S. Razin, S. Rottem. New York: Acad, press, 1982. — Vol. 17. — Р. 79—151.), характеризуется следующей структурой: фундаментом липида А служит дифосфорилированный дисахарид D-глюкозамина 2-амино-2-дезоксид-Д-глюкоза, ацелированная жирными кислотами.

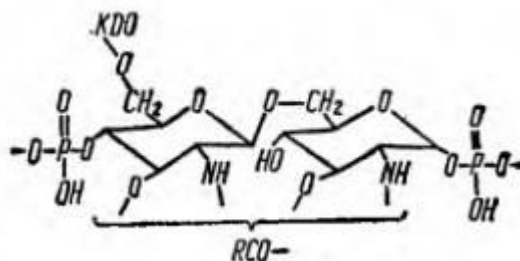


Рисунок 1- Структура Липида А из *P. Aeruginosa*

(Kasai N., Arata S., Mashimo I. et al. *Pseudomonas dim inuta* LPS with a, new endotoxic lipid A structure 11 Biochem. and Biophys. Res. Communs. — 1987. — 142. — Р. 972—978.)

Присутствие жирных оксикислот, и прежде всего 3-оксикислот, — отличительная особенность липида А грамотрицательных бактерий. Также стоит отметить что, более важный вклад в решение таксономических и филогенетических вопросов приподносит жирнокислотный состав липида А.

Патогенные свойства ЛПС зависят, в основной мере, от липида А, но если удалить данный липид, то токсические свойства ЛПС теряются. Взаимодействие с клетками макроорганизма и бактерии происходит за счет рецепции элементов ЛПС на молекулярных паттернах, которые специализируются на распознавании патогенов. Рецепция эндотоксина диких штаммов *P. aeruginosa* запускает ряд иммунологических реакций, которые в последствие обеспечивают подавление данного патогена. Однако стоит отметить, что клинические штаммы *P. aeruginosa* характеризуются модифицированным строением липида А, который «извращает» иммунные реакции макроорганизма, что в дальнейшем приводит к благополучному выживанию бактерий и местному гиперповреждению тканей и органов за счет аутоагрессии иммунных эффекторов. (Cigana C., Curcurù L., Leone M.R., Ieranò T., Lorè N.I., Bianconi I., et al. *Pseudomonas aeruginosa* exploits lipid A and mucopeptides modification as a strategy to lower innate immunity during cystic fibrosis lung infection. PloS one 2009; 4(12):e8439.)

Роль связующего элемента в этой цепи между липидом А и О-специфическим полисахаридом в молекуле ЛПС выполняет кор-олигосахарид. Полная структура коровых олигосахаридов не полностью установлена лишь у двух штаммов *P. aeruginosa*, состав кора у других представителей рода *Pseudomonas* исследован хуже. Полученные данные приводит к тому выводу что, значительно большей изменчивости подвергается кор, нежели липида А. Кор ЛПС *P. aeruginosa* содержит такие вещества как: глюкозу, рамнозу, галактозамин, гептозу, аланин и 2-кето-3-дезоксиктоновую кислоту (КДО). Кроме общих структурных

элементов, присущих кору ЛПС грамотрицательных бактерий, характерными составляющими компонентами кора псевдомонад являются рамноза и α-аланин. Таким образом, несмотря на то, что биохимический состав и пространственная структура коровых олигосахаридов бактерий рода *Pseudomonas* изучены далеко неполностью, имеющиеся научные данные сообщают об их значительном разнообразии в серьезных отличиях от кора ЛПС микроорганизмов других таксономических групп.

О-специфический полисахарид (О-ПС). Наибольшая изменчивость пространственной организации по сравнению с другими частями молекулы ЛПС претерпели О-специфические боковые цепи, которые обуславливают серологическую специфичность бактерий. Каждой О-серогруппе внутри вида характерна определенная химическая последовательность О-цепи; последние могут значительно или в некоторых моментах (либо природой боковых заместителей, либо положением одной из гликозидных связей в линейной цепи) иметь различия между собой. Строение О-специфических полисахаридов бактерий рода *Pseudomonas* изучено еще крайне слабо, хотя в последние годы в этой области получен ряд интересных научных экспериментальных результатов. Наиболее изученным видом является *P. aeruginosa*, для большинства известных О-серотипов которого уже установлены структурные организации О-специфических полисахаридов (Книрель Ю. А. Липополисахариды грамотрицательных бактерий/ / Прогресс химии углеводов. — М.: Наука, 1985. — С. 54—76.). О-ПС содержат большое количество самых различных, в том числе даже уникальных, аминосахаров, в то время как стандартные для энтеробактерий нейтральные моносахариды, за исключением рамнозы, встречаются крайне редко. Не так часто встречающиеся в других полисахаридах 6-дезоксигексозамины (D-хиповозамин, D- и L-фукозамин) входят в состав ЛПС почти всех серотипов синегнойных бактерий. Некоторые полисахариды содержат также кислые моносахариды: аминуроновые, диаминоуроповые и диаминононулозоновые кислоты.

Похожим по структуре некоторым серогруппам *P. aeruginosa* оказался О-специфический полисахарид *P. aurantiaca*, содержащий N-ацетил-1-фукозамин и ди-N-ацетил-О-бациллозамин (Веремейченко С. Н. Изучение липополисахаридов бактерий группы *Pseudomonas fluorescens*: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. — Киев, 1988. — 22 с). Минорный полисахарид, который представляет из себя D-рамнан, был найден у ряда штаммов *P. aeruginosa*, а моноклональные антитела к нему связывались с разнообразными серотипами синегнойной палочки (Sawada S., Kawamura T., Masuho Y., Tomibe / . A New common polysaccharide antigen of strains of *P. aeruginosa* detected with a monoclonal antibody // J. Infect. Diseases. — 1985. — 152, N 6. — P. 1290—1299., Yokota Sh., Kaya Sh., Sawada S. et al. Characterization of a polysaccharide component of LPS from *Pseudomonas aeruginosa* D 1008 (ATCC 27584) as D — rhamnan / / Eur. J. Biochem. — 1987. — 167, N 1. — P. 203—209.). Упираясь на эти данные выдвинута, гипотеза о том, что D-рамнан данной структурной организации может являться общим внутривидовым антигеном *P. aeruginosa*. Выявление у других представителей рода *Pseudomonas* D-рамнанов с близкими, хотя и несколько различающимися структурами стало весомым основанием для предположения, что D-рамнан может являться и общим внутриродовым антигеном псевдомонад. Для проверки таковой гипотезы необходимы дальнейшие структурные экспериментальные исследования липополисахаридов различных видов рода *Pseudomonas*. Стоит отметить что, центральный олигосахарид также имеет антигенные и иммунномоделирующие свойства. В зависимости от ее строения проводятся серологическое типирование бактерий. Она состоит из различных углеводов (галактоза, глюкоза, манноза), специфичных для бактерий сахаров: абеквоза, паратоза, политоза (Novotny A. M., Thomas S., Duron O.S., 1963).

Бактерии, имеющие полный комплекс ЛПС, образуют S-колонии. Данные колонии имеют ровные края и гладкую поверхность, а также

наиболее выраженные патогенные свойства. Бактерии с нарушенным синтезом ЛПС (нет О-боковой цепи и части сердцевинного полисахарида) образуют R-колонии: неровный край, шероховатая поверхность, патогенные свойства понижены (Rietschel et al., 1994).

Данные полученные из полногеномного секвенирования внесли существенный вклад в понимание механизмов биологического синтеза ЛПС различных грамотрицательных бактерий и доказали, что существенную роль в структурном разнообразии ЛПС играет горизонтальный перенос генов (Федореева Л.И., Соловьева Т.Ф., Оводов Ю.С., 1989). Гены биосинтеза 3 составляющих частей ЛПС как правило находятся в различных местах хромосомы, часто в виде отдельных локусов. Большая часть генов биосинтеза ЛПС, кодирующих ферменты для метаболизма углеводов и липидов, делятся на три основные группы: гены биосинтеза нуклеотид -сахаров и жирных кислот; гены, кодирующие трансферазы; гены процессинга (Brandenburg K., Andra J., Miiller M., Koch M.H.J., Garidelc P., 2003; Brandenburg K., Jurgens G., Andra J., Lindner B., Koch M., Blume A., Garide P., 2002).

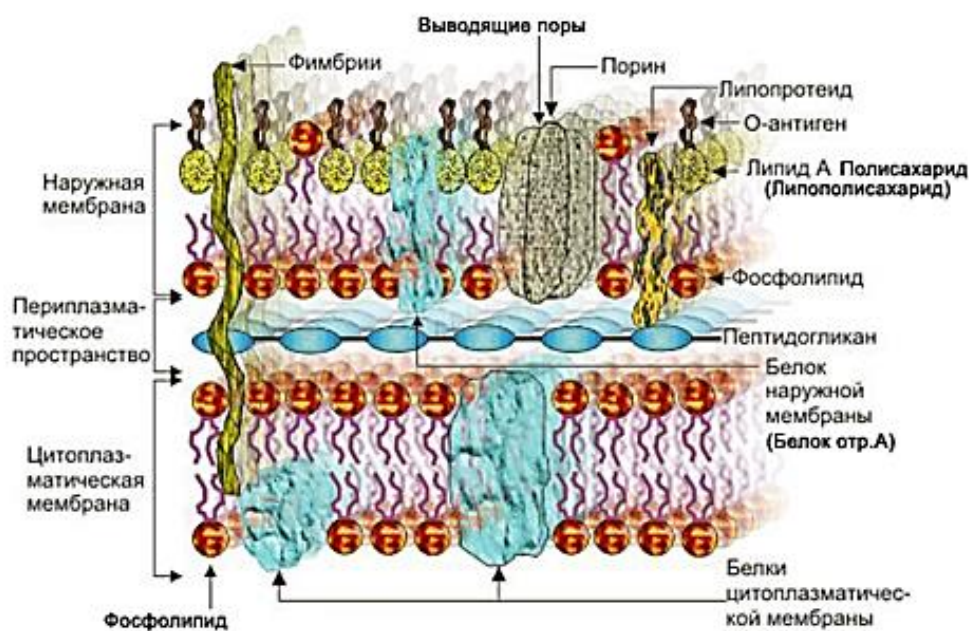


Рисунок 2 - Строение стенки грамотрицательных бактерий (Rietschel et al., 1994)

Во время своей жизни бактериальные клетки активно взаимодействуют с окружающей средой, а патогенные бактерии - с организмом хозяина. В последнем случае это взаимодействие происходит, со стороны макроорганизма на уровне клеток и гуморальных факторов - элементов иммунной системы, а со стороны бактерий - на уровне макромолекул и их различных комплексов, находящихся на поверхности мембраны бактериальных клеток (Набережных Г.А., Хоменко В.А., Красикова И.Н., Ким Н.Ю., Соловьева Т.Ф., 1996).

Липополисахарид занимает около 45% ее поверхности и представляет собой амфифильную молекулу (т. е. имеющую свойства как лиофильные, так и лиофобные одновременно), содержащую гидрофобный липидный элемент (липид А) и ковалентно связанную с ним гидрофильную полисахаридный элемент (Lugtenberg B., Van Alphen L., 1993). В наружной мембране бактериальной клетки ЛПС специфически взаимодействуют с белками, при этом образуя устойчивые к химическим и токсическим воздействиям ЛПС-белковые комплексы (ЛПБК). Эти комплексы играют наиважнейшую роль в организации и функционировании всей бактериальной мембраны и в некоторой степени определяют ее биологические свойства. Специфическое взаимодействие ЛПС с белком дает возможность формировать пространственные структуры последнего и закрепление его в мембране. Существенным доказательством присутствия связи между белком и ЛПС является функциональная активность комплекса, которая проявляется только при наличии обоих элементов данного комплекса (Elsbach P., Weiss J., 1993).

Изучением и исследованием структурной организации ЛПС были заняты десятки групп научных исследователей в разных странах мира и в разное время, и в этом направлении были достигнуты колоссальные успехи (Ашмарин И.П., Воробьев А.А., 1962; Гершанович М.Л., 1982; Кузнецов В.П., Беляев Д.Л., Бабаянц А.А., 1996; Лиходед В.Г., Юшук Н.Д., Яковлев М.Ю., 1996; Куцепко С.А., 2004), что особенно важно для практической

медицины микробиологии и генной инженерии, так как полисахаридная часть ЛПС зачастую служит характерным антигеном патогенных бактерий, который узнается иммунной системой организма.

Данная способность ЛПС, образовывать с белками наружной мембраны сопряженные комплексы, подтверждена многими экспериментами, как *in vitro*, так и *in vivo*, однако информация о надмолекулярной структуре и свойствах ЛПБК, их взаимодействиях в водных средах весьма скудны.

Проявление физиологической активности эндотоксинов в основном зависит от их третичной структуры. Поэтому лишь имея соответствующую информацию о макромолекулярной организации ЛПС и ЛПБК, возможно вполне объемно решить основную задачу биохимии эндотоксинов - узнать молекулярные механизмы их биологического действия (Кузнецов В.П., Беляев Д.Л., Бабаянц А.А., 1996).

Взаимодействие ЛПС с белком не лимитируется только наружной мембраной бактерий. При попадании в макроорганизм ЛПС начинает взаимодействовать с самыми различными веществами: белками сыворотки и бактерицидными белками макроорганизма и сама по себе является мишенью для антибактериальных веществ поликатионного происхождения, которые используются при лечении организма при бактериальных инфекций (Онищук О.П., Шарыпова Л.А. Курчак О.Н., 2005). В таком случае комплексы ЛПБК, выделенные из бактериальной мембраны, могут являться удобным шаблоном для исследования ЛПС - белковых взаимодействий.

Среди богатого спектра биологической активности ЛПС и ЛПБК, особое должное внимание научных исследователей привлекает их токсичность и способность активировать клетки иммунной системы макроорганизма. В настоящее время принцип проявления активности токсина в организме вполне понятен. Результатом специфического взаимодействия ЛПС или ЛПБК с клетками организма является синтез

биологически активных медиаторов - цитокинов, которые при низкой концентрации могут регулировать работу иммунной системы организма, а при высокой – могут вызывать развитие сложной гаммы токсических эффектов, таких как пирогенность, лейкопения, септический шок, объединяемых термином «бактериальный эндотоксикоз» (Ронин В.С., 1989). В связи с этим в настоящее время разрабатываются различные способы нейтрализации токсического действия ЛПС и использования в научных целях его ценных свойств. Для реализации этих целей активно исследуются и используются антибиотики или синтезированные на их основе пептиды; моноклональные антитела к ЛПС; ингибиторы цитокинов; малотоксичные ЛПС, которые обладают свойствами антагонистов; липосомальные вакцины (Хиггинс К., 2010), а также вещества, нейтрализующие действие ЛПС за счет вступления с ними во взаимосвязь и дальнейшим образованием комплексов.

Среди перечисленных веществ наиболее перспективными являются поликатионные антибактериальные пептиды и их синтетические аналоги, как новые потенциальные антисептические лекарства, для которых ЛПС является в роли непосредственной мишенью благодаря высокому отрицательному заряду за счет фосфатных, пиррофосфатных и карбоксильных групп, находящихся во внутренней составляющей кора и липиде А - токсическом оружии ЛПС.

Несмотря на многозначительные успехи, достигнутые при исследовании взаимодействий ЛПС с различными рода белками, большинство биохимических и биофизических факторов, лежащих в их основе, остаются до конца неизученными (Кузнецов В.П., Беляев Д.Л., Бабаянц А.А., 1996).

ЛПС высвобождается из бактериальных клеток при их гибели в результате аутолиза(самопереваривания) под действием различных веществ, таких как токсины и антибиотики. Из ЖКТ ЛПС могут проникать в ткани и органы организма через портальную вену или через кишечную

лимфатическую систему. Это может привести к различным тяжелым последствиям в организме: существенно снизить количество употребляемой еды, активность липопротеинлипаз в мышцах и костях, содержание липопротеинов в составе плазмы крови, нарушить синтез жирных кислот в печени, увеличить в крови уровень ненасыщенных жирных кислот и триглицеридов, вывести из баланса клеточный гликоген. ЛПС вызывают тяжелые клинические проявления токсикоза, сопровождающегося слабостью, одышкой, нарушением сердечной деятельности. Низкие концентрации ЛПС стимулируют фагоцитоз, вызывают агрегацию тромбоцитов, повышают температуру тела и липосидеремию. Они вызывают неспецифическую пролиферацию Т и В клеток, усиливают работу макрофагов, стимулирует иммунный ответ, повышают противоопухолевую резистентность, улучшает естественную устойчивость к различным роду инфекциям и аутоиммунные реакции (Freudenberg M.A., Galanos C., 1989).

1.2. Применение липополисахаридов в медицине

Некоторые бактериальные ЛПС имеют практическое применение в медицине, например такие как, пирексал и пирогенал. Эти вещества были выделены из различных грамотрицательных микроорганизмов, и их названия говорят сами за себя – повышать температуру тела макроорганизма (Должко Д.В., 2017).

Пирогенал следует рассматривать как поддающийся дозировке неспецифический стрессор, вызывающий санациогенный стресс, мобилизующего защитные силы организма (Голощапова Е.Н., 1997). Так, пирогенал как санациогенный стрессор стимулирует нормальную перестройку на новом уровне реципрокных взаимодействий между симпатическим и парасимпатическим тонусом. ЛПС, в первую очередь, используется для активизации иммунитета и неспецифической

резистентности макроорганизма: при очень высокой температуре более усилено происходит синтез антител, интерферонов, интерлейкинов и других цитокинов, проявляется общее повышение работоспособности окислительного метаболизма и более усиленное образование токсичных для бактерий и других различных паразитов свободных радикалов, усиление лейкопоза и развитие гиперлейкоцитоза, хемотаксиса и фагоцитарной деятельности лейкоцитов. Именно с иммуноактивацией связывают эффективность пиротерапии при различных вялотекущих, хронических инфекционных заболеваниях, в норме протекающих в организме без температурного изменения, без ярко выраженного воспаления и без формирования подавленного иммунитета. Во-вторых, эффективность пиротерапии при различных заболеваниях обусловлена повышением проницаемости сосудов и тканевых барьеров организма не только для иммунных клеток и факторов гуморального иммунитета, но и для антибиотиков и других лекарственных препаратов. С повышением проницаемости гематоэнцефалического барьера для антибиотиков и химических препаратов связывают высокую эффективность пиротерапии при сифилитическом энцефалите т.е., прогрессирующем параличе, а также токсоплазмозе ЦНС и других инфекциях нервной системы; для антидепрессантов и антипсихотиков – при устойчивых долговременных депрессиях и психозах. С повышением проницаемости гематопростатического барьера для антибиотиков обуславливают эффективность пиротерапии при хроническом простатите. В-третьих, эффективность пиротерапии на прямую зависит от свойств самих патогенов, вызывающих заболевания, которые в свою очередь не способны размножаться или плохо размножаются при повышении температуры тела самого макроорганизма. (Б.В.Пинегин, А.М.Борисова, Н.В.Хоршилова и др., 1996; Манько В.М., Петров Р.В., Хаитов Р.М., 2002).

Среди большого спектра биоактивности ЛПС и ЛПБК, главное внимание ученых привлекает их токсичность и возможность активировать

клетки иммунной системы. Результатом специфического взаимоотношения ЛПС или ЛПБК с клетками макроорганизма является биологический синтез активных медиаторов - цитокинов, которые при низкой концентрации управляют работой иммунной системы макроорганизма, а при высокой - вызывают развитие тяжелой гаммы токсических воздействий, таких как пирогенность, лейкопения, септический шок, объединяемых под общим понятием «бактериальный эндотоксикоз» (Ронин В.С., 1989). В связи с этим, в настоящее время, ведутся разработки способов нейтрализации токсического воздействия ЛПС и использования его широких возможностей. Для данных поставленных задач активно изучаются антибиотики или синтезированные на их основе белки; моноклональные антитела к ЛПС; ингибиторы цитокинов; малотоксичные ЛПС, имеющие свойства антагонистов; липосомальные вакцины (Хиггинс К., 2010), а также соединения, нейтрализующие воздействие ЛПС за счет построения с ними комплексов.

Среди этих перечисленных веществ более перспективными являются поликатионные антибактериальные белки. Это пептиды и их синтетически созданные аналоги, как новые потенциальные антисептические препараты, для которых ЛПС является мишенью из-за высокого отрицательного заряда за счет фосфатных, пиррофосфатных и карбоксильных групп, находящихся во внутренней части кора бактерии и липиде А - токсическом центре ЛПС.

Иммунная система — это наисложнейшая функциональная система человеческого организма, которая обязана, в первую очередь, поддерживать гомеостаз органов, тканей и клеток, а во вторую — защищать организм от агрессии, возникшей в результате проникновения различных патогенных факторов. (Караулов А.В., 1999).

Микробные ЛПС преимущественно оказывают влияние на В-лимфоциты и производимость эндогенных интерферонов. Данное влияние связано с взаимодействием ЛПС с ЛПС-связывающим белком (рис. 2).

Липополисахарид-связывающий белок (ЛСБ, lipopolysaccharide binding protein, LBP) — секретируемый белок, элемент острой фазы воспаления, который связывает с высокой афинностью бактериальный ЛПС и улучшает связывание с ним CD14. Исходя из этого, ЛСБ обеспечивает первый этап в процессе моноцитарного иммунологического ответа (Воробьев А.А., 2002).

В последние годы для стимулирования работы иммунитета чаще применяется продигиозан, который хорошо переносится пациентами, он улучшает работу факторов неспецифической и специфической резистентности организма, стимулирует иммунокомпетентные клетки (В- и Т-лимфоциты), индуцирует производимость эндогенных интерферонов, повышает работоспособность дополнительных факторов иммунного ответа (макрофаги и др.), увеличивает фагоцитарную деятельность организма, ускоряет антителообразование, выход в циркуляторное русло В-лимфоцитов, повышает уровень иммуноглобулинов, подавляет инфекционно-воспалительные процессы. Продигиозан владеет способностью стимулировать неспецифическую реактивность организма человека к инфекции, увеличивая скорость выздоровления. При введении продигиозана можно заметить пирогенный эффект, кратковременная лейкопения, которая может смениться лейкоцитозом (Соловьева Т.Ф., Оводов Ю.С., 1983).

Наличие большого количества побочных эффектов у иммуномодуляторов данного класса говорит о необходимости поиска новых естественных липополисахаридов, которые будут обладать наименьшей токсичностью и пирогенностью, но которые будут иметь такую же высокую иммуностимулирующую активность.

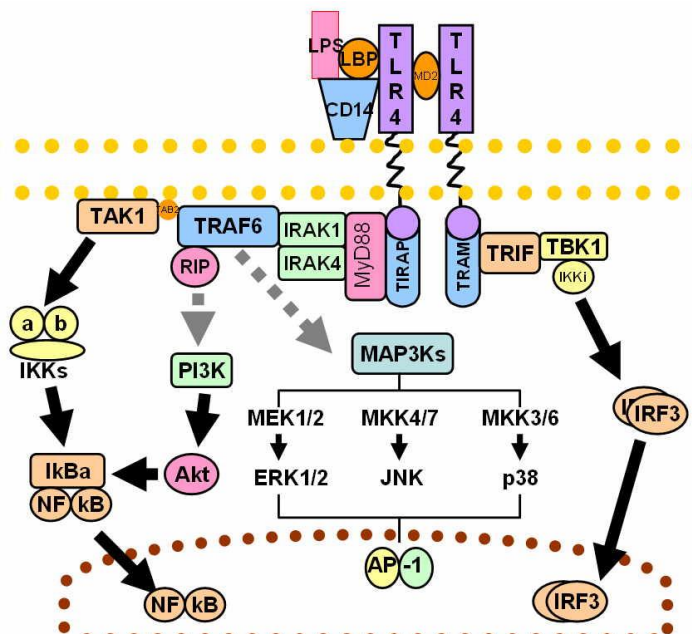


Рисунок 3 - Эффекты взаимодействия ЛПС с ЛПС-связывающим белком (Dziarski R, Wang Q, Miyake K, et al., 2001)

Доказательством перспективности поисков новых иммуномодуляторов среди ЛПС является синтез сальмозана, который представляет полисахаридную фракцию О-антигена бактерий брюшного тифа. Данное соединение получено путем депротеинизации фенола антигена с последующим устранением липида А при гидролизе в ацетате. Сальмозан малотоксичен, почти не содержит в своем составе пептидов и липидов. Введенный лабораторным мышам сальмозан играет в организме роль индуктора пролиферации и дифференциации стволовых клеток, стимулирует антителогенез и фагоцитарную работоспособность лейкоцитов и макрофагов, повышает титр лизоцима в крови, активизирует неспецифическую резистентность к инфекциям (Гремякова Т.А., Фомченков В.М., Фурсова Н.К., Волковой К.И., 1996).

Свойство сальмозана активировать иммунитет проявляется как у животных, имеющих интактный иммунный статус, так и у животных с наличием иммунитета, но подавленный облучением. Стоит отметить что, введение этого полисахарида до облучения позволяло повысить

сниженную природную резистентность к экспериментальной инфекции до 900 раз.

Анализ стимулирующего действия сальмозана на пролиферативные процессы в лимфоидных и кроветворных органах показал его важные особенности в сравнении с ранее известными ЛПС. Стало очевидным, что сальмозан может вызывать фазовые изменения пролиферации: короткий период снижения интенсивности пролиферативных процессов сменяющиеся в дальнейшем их усилением. Поскольку последующие инъекции не оказывают усиления эффекта, то стоит предполагать, что стимуляция опосредована через образование эндогенных регуляторных факторов, к тому же что у сальмозана митогенных свойств не обнаружено, что говорит об отсутствии в его молекуле липида А (Гремякова Т.А., Фомченков В.М., Фурсова Н.К., Волковой К.И., 1996).

1.3. Характеристика бактерии *Pseudomonas aeruginosa*

К роду *Pseudomonas* относятся неспорообразующие грамотрицательные палочки, чаще всего бывают прямые, редко слегка изогнутые. Обычно, клетки находятся в препаратах одиночно, реже попарно. Размеры клеток различных видов псевдомонад вариативны, бывают: от 1 до 3,5—5,0 мкм в длину при ширине 0,5— 1,5 мкм. Большинство из них представляют собой тонкие палочки. Однако этот морфологический критерий весьма нестабилен, неоднократно замечалось значительные изменения размеров бактерий при выращивании штаммов различных видов в условиях аэрации с целью получения антибиотических препаратов и других биологически активных веществ.

Практически все штаммы данного рода имеют активную подвижность, которая обуславливается благодаря полярно расположенными жгутиками. По данным Джессена (Jessen O. *Pseudomonas aeruginosa* and other green fluorescent *pseudomonads*. — Munksgaard, Copenhagen, 1965. —

240 р.), не подвижны 6 % штаммов *P. aeruginosa*. Единичные безжгутиковые варианты также могут встречаться и среди других видов данного рода.

Число жгутиков, определяемое на препаратах статистически, имеет важное таксономическое значение для видовой дифференциации бактерий рода *Pseudomonas*. Среди исследованных ныне культур лофотрихияльное жгутикование отмечалось у *P. Fluorescens*, *P. putida*, *C. acidovorans*, *X. maltophilia* и др., у монотрихияльное — у *P. aeruginosa*, *P. alcaligenes*, *P. pseudoalcaligenes*, *P. stutzeri*, *P. mendocina*, *P. vezicularis*. При этом отдельные виды различались даже по длине жгутиков (достигающей до 10 мкм), числу изгибов, длине амплитуды волны жгутика. В электронно-микроскопических препаратах штаммов *Pseudomonas sp.* мы наблюдали перитрихияльно расположенные фимбрии или пили. Впервые эти образования были обнаружены у псевдомонад Фуэрстом и Хейвордом (Fuerst J. A., Hayward A. Surface appendages similar to fimbriae (pili) von *Pseudomonas* species//J. Gen. Microbiol. — 1969. — 58, N 2. — P. 227—237.): перитрихияльные — у *P. cepacia* и *P. fragi*, полярные — у *P. aeruginosa*, *C. acidovorans*, *C. testosteroni*, *X. maltophilia*, *P. alcaligenes* и *P. solanacearum*. Фимбрии характеризуют «скользящую подвижность» флюоресцирующих бактерий рода *Pseudomonas*, лишенных жгутиков (Bradley D. A. Function of *Pseudomonas aeruginosa* polar pili: twitching motility // Can. J. Microbiol.— 1980.— 26, N 1.— P. 146—154.), и играют наиважнейшую роль в процессах инфицирования, позволяя бактерии прикрепиться к поверхности клетки (Buchanan T., Pearce W. Pathogenic aspects of outer membrane components of Gram-negative bacteria // Bacterial outer membranes, biogenesis and function.— New York : Wiley and Sons, 1979.— P. 475—514.).

Клеточная стенка и мембрана бактерий рода *Pseudomonas* типичны для грамотрицательных бактерий. С помощью электронной микроскопии в клетках *P. aeruginosa* были найдены мембранные структуры по типу

мезосом (Hoffman H. P., Geftic S. C., Heumann H., Adair F. W. Mesosomes in *Pseudomonas aeruginosa* // J. Bacteriol.— 1973.— 114, N 2.— P. 434—438., Young H. O., Chao F., Turnbull C., Philpott D. E. Ultrastructure of *Pseudomonas saccharophila* at early and late log phase of growth // J. Bacteriol.— 1972.— 109, N 2.— P. 862—868.). Мезосомы равномерно распределяются по всей клетке и имеют вид пузырьков или коротких канальцев. В отдельных случаях можно увидеть их связь с цитоплазматической мембраной.

Одним из многочисленных цитологических критериев, ранее предложенных для дифференцировки видов рода *Pseudomonas*, является образование бактериями гранул резервного соединения поли- β -оксимасяной кислоты. Таксономическая ценность данного признака у псевдомонад впервые была установлена исследованиями Форсита и соавт. (Forsyth W. G., Hayward A. C., Roberts J. B. Occurrence of poly- β -hydroxybutyric acid in aerobic gram-negative bacteria // Nature. — 1958. — 182, N 4638. — P. 800.).

У единичных штаммов флюоресцирующих бактерий рода *Pseudomonas*, в клетках которых, по литературным источникам, нет поли- β -оксимасяной кислоты, но иногда наблюдаются включения, окрашиваемые черным Суданом. Возможно, окраска этим красителем не является высокоспецифичной в наше время для поли- β -оксимасяной кислоты и выявляет другие возможные резервные жировые материалы, накапливающиеся в клетке бактерии в условиях дефицита в окружающей его среде азота. Такая неспецифичность снижает, с дифференцирующей точки зрения, таксономическую ценность этого действительно важного цитологического критерия.

У бактерий рода *Pseudomonas* по сравнению с другими микроорганизмами общее количество ДНК в геноме достаточно велико: 3624 килобаз у *P. aeruginosa*. (Holloway B. W., Morgan A. F. Genome organisation in *Pseudomonas* // Ann. Rev. Microbiol. — 1986. — 40. — P.

79— 105.). Одним из важных параметров ДНК, часто используемых в исследованиях по таксономии и идентификации микроорганизмов, является молярное содержание ГЦ пар (%), т. е. количественный показатель соотношения гуанина к урацилу ДНК бактериального генома.

Представители рода *Pseudomonas* изучены с этой стороны достаточно полно (Блохина И. Н., Леванова Г. Ф. Геносистематика бактерий. — М.: Наука, 1976. — 150 с). Наиболее углубленное исследование было предпринято Мандель (Mandel M. Deoxyribonucleic acid base composition in the genus *Pseudomonas* // J. Gen. Microbiol. — 1966. — 43, N 3. — P. 273—292.), которая проанализировала ГЦ-содержание ДНК у 165 штаммов различных видов псевдомонад.

По нуклеотидному составу ДНК бактерии рода *Pseudomonas* представляют собой достаточно укомплектованную группу: данный показатель варьирует у них в пределах 58—70 %. (Kodama K., Kimura N., Komagata K. Two new species of *Pseudomonas*: *P. oryzae* isolated from rice paddy and clinical specimens and *P. luteola* isolated from clinical specimens // Int. J. Syst. Bacteriol. — 1985. — 35, N 4. — P. 467—474). Колебания в ГЦ-составе ДНК внутри рода, обычно, не превышают 10%; внутри вида — не более 1 %. По данным де Лея (De Ley J. DNA-base composition and hybridization in the taxonomy of phytopathogenic bacteria // Ann. Rev. Phytopathol. — 1968. — 6. — P. 63—90.) ГЦ-содержание ДНК штаммов фитопатогенных бактерий рода *Pseudomonas* колеблется несильно и в достаточно узких пределах ($60,5 \pm 1,2$), что, с генетической точки зрения, свидетельствует об их довольно тесном родстве и общем эволюционном развитии и происхождении.

Среди более чем 100 соединений различного химического происхождения, испытанных на псевдомонадах в качестве единственного источника углерода, наиболее универсальным субстратом для них являлась пировиноградная кислота, которую усваивали 98 % штаммов различных видов. Далее по степени доступности и возможности

выращивания располагались а-кетоглутаровая, янтарная и фумаровая кислоты. Уксусная и молочная кислоты поддерживали рост не всех бактерий, лишь 79 и 87 % штаммов соответственно. Поэтому пируват представляется более лучшим источником углерода при постановках экспериментов на способность бактерий к росту на искусственных средах с добавлением минеральных форм азота. Из аминокислот более легкоусвояемым в качестве источников углерода является пролин (потребляется 97 % штаммов) и а-аланин (90 %). Также наряду с универсальными субстратами, потребляемыми практически всеми или большинством штаммов, ряд веществ избирательно усваивался определенными видами. Это крахмал (*P. stutzeri*), мальтоза (*P. stutzeri*, *X. maltophilia*), целлобиоза (*X. maltophilia*, *P. vezicularis*, *P. paucimobilis*), салицин (*P. ceracia*, *P. paucimobilis*), ацетамид (*P. aeruginosa*, *C. acidovorans*) и др. Обнаружены к тому же соединения, которые наряду с описанными выше избирательно усваиваются определенными видами рода *Pseudomonas*.

У бактерий рода *Pseudomonas* весьма распространена и имеет диагностическое значение способность бактерий к ассимиляции этанола. Ряд штаммов *P. aeruginosa*, *P. fluorescens*, *P. putida*, *P. aurantiaca*, *P. mendocina* и «*P. rathonis*» хорошо растут на синтетической среде с 1 % этанола в качестве лишь единственного источника углерода, однако только 41 штамм прекрасно развиваются на той же среде, но уже с добавлением 2,5 % этанола. Большое число из них принадлежат к видам флюоресцирующей группы — *P. aeruginosa* и *P. putida*. Рост в основном сопровождается интенсивной желто-зеленой флюоресценцией. В дальнейшем было доказано, что представители рода *Pseudomonas* способны использовать этанол в качестве единственного источника углеродного питания в условиях глубинного культивирования, накапливая при этом культуральную биомассу, полноценную по аминокислотному, ферментативному и витаминному составу (Квасніков Є. І., Ісакова Д. М.,

Кіпріанова О. А. та ін. Бактерії роду *Pseudomonas*, що засвоюють етанол // Мікробіол. журн.— 1974. — 36, № 6. — С. 683—685.). Также многие испытанные штаммы *P. aeruginosa*, *P. cepacia*, *P. stutzeri* и *P. mendocina* росли на средах с грозненским парафином, содержащим среднецепочечные алканы (от C14 до C22).

Доказано, что п-нитроанилин, капролактан, поверхностно активные соединения сульфанола и алкил сульфоната могут использоваться псевдомонадами в качестве единственного источника углерода, но лишь единичными штаммами данного рода. Способность к усвоению анионного поверхностно активного вещества додецилсульфата натрия (ДДС) широко распространена у псевдомонад и присуща также лишь определенным видам этого рода (Киприанова Е. А., Ставец-я С. С., Бойко О. И., Кривец И. А. Усвоение додецилсульфата натрия & бактериями рода *Pseudomonas* // Микробиол. журн,— 1978,— 40, № 4 .^ С . 503—505.). Более активными деструкторами ДДС считаются штаммы *P. aeruginosa* и *P. aureofaciens*. Вокруг колоний бактерий этих видов на чашках с ДДС образовывались довольно крупные по размеру прозрачные зоны уже через 24 ч инкубации. Потребление ДДС микроорганизмами происходило и в условиях аэрации. Будучи являясь строгими аэробами, бактерии рода *Pseudomonas* используют кислород в качестве конечного акцептора электронов. Многие виды способны использовать для данной цели нитраты, осуществляя при росте в анаэробных условиях так называемое нитратное дыхание. Анаэробное восстановление нитрата — денитрификация — полезный для бактерий диагностический признак, отличающий *P. aeruginosa*, отдельные биовары *P. fluorescens* и другие виды. Это свойство легко теряется в процессе лабораторного культивирования бактерий и обладает не самой лучшей воспроизводимостью в различных лабораториях (Sneath P. H., Collins V. G. A study in test reproducibility between Laboratories: report of a *Pseudomonas* working Party / / Antoni van Leeuwenhoek J. Microbiol, and Scrol.— 1974.— 40, N 4.— P. 481—527.). Процесс денитрификации

происходит через стадию восстановления нитратов до нитритов и далее — до свободного азота, а в некоторых случаях и до N_2O . Также наблюдалась способность образования газообразного азота в анаэробных условиях на средах с нитратом у всех штаммов *P. aeruginosa*. (Киприанова Е. А., Гарагуля А. Д., Леванова Г. Ф. и др. Штамм *Pseudomonas stutzeri*, неспособный к денитрификации // Там же. — 1983. — 45, № 2. — С. 88—90)

Аргининдигидролаза. Система аргининдигидролазы включает в себя фермент, способный образовывать из аргинина цитруллин, и цитруллинуредазу, которая в дальнейшем разлагает цитруллин до орнитина, CO_2 и аммиака. Присутствие у бактерий рода *Pseudomonas* данного комплекса ферментов впервые изучено Шеррисом и соавт. (Sherris J. S., Shoesmith J. G., Parker J. G., Breckon M. T. Tests for the rapid breakdown of arginine by bacteria: their use in the identification of *Pseudomonas* s//J. Gen. Microbiol. — 1959. — 21, N 2. — P. 389—396.). В наше время определение аргининдигидролазной активности довольно часто применяется для идентификации различных видов рода *Pseudomonas*. Эта система ферментов была обнаружена у всех штаммов *P. aeruginosa*, *P. aureofaciens*, *P. chlororaphis*, «*P. lemonnierii*», *P. mendocina*, *P. fragi*, *P. taetrolens* и у подавляющего большинства штаммов *P. fluorescens*, *P. putida*, *P. alcaligenes*, *P. pseudoalcaligenes*, «*P. rathonis*».

Декарбоксилазы лизина. Экспериментами Фозерхилла и Геста (Fothergill J. C., Guest J. R. Catabolism of ϵ -Lysine by *Pseudomonas aeruginosa* //J. Gen. Microbiol. — 1977. — 99, N 1. — P. 139—155.) расшифрован биохимизм расщепления ϵ -лизина бактериями рода *Pseudomonas*. Аэробные псевдомонады могут осуществлять данный процесс различными путями: к примеру, через кадаверин (*P. aeruginosa*). Разнообразны и пути катаболизма триптофана у различных видов псевдомонад: ароматический у *P. fluorescens*, хинолиновый у *C. acidovorans*, хиназолиновый у *P. aeruginosa*. Синегнойная палочка может

метаболизировать триптофан до ароматического соединения о-аминоацетофенона (Mann S. Taxonomic studies of tryptophan breakdown in *Pseudomonas aeruginosa* / Spisy Prirodoved fak. Univ. Brne — 1970. — N 1/6. — P. 27—35). Данная способность *P. aeruginosa* предложена как тест на это вещество для дифференциации *P. aeruginosa* от *P. fluorescens* (Cox C. D., Parker J. Use of 2-aminoacetophenone production of *Pseudomonas aeruginosa* / J. Clin. • Microbiol. — 1979. — 9, N 4. — P. 479—484.). Среди ферментов аминокислотного обмена стоит обратить внимание на тирозиназы, которые осуществляют синтез из тирозина темно окрашенных пигментов группы меланинов. Меланиногенные штаммы найдены у *P. aeruginosa*, *P. fluorescens* и некоторых фитопатогенных псевдомонад. У многих видов рода *Pseudomonas* способность к синтезу меланинов не изучена, а вопрос о химической природе этих пигментов до сих пор остается загадкой. Так, по исследовательским данным Манна (Mann S. Ober melaninbildende Stamme von *Pseudomonas aeruginosa* // Arch. Microbiol. — 1969. — 65, N 4. — P. 359—379.), меланины сине-зеленой палочки служат метаболитами превращения гомогентизиновой кислоты и не имеют ничего общего с меланинами животных. Другие исследователи (Рожавин М. А. Биологические свойства меланинообразующих штаммов *Pseudomonas aeruginosa*: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. — Киев, 1982. — 26 с) причисляют меланины *P. aeruginosa* по их химическим свойствам к «истинным» меланинам. При биологическом синтезе меланина в процессе гидроксирования l-тирозина получается l-3,4-диоксифенилаланин (l-ДОФА) — это наиважнейший интермедиат аминокислотного обмена, действенное фармакологическое лекарство при лечении болезни Паркинсона и некоторых других заболеваний (Wick M. M. L-DOPA methyl ester: Prolongation of survival of neuroblastoma-bearing mice after treatment/ / Science. — 1978. — 199, N 4330. — P. 775—776.).

1.4. Иммунодефициты и их коррекция

Иммунологические реакции существуют благодаря двум тесно связанным между собой элементам иммунной системы — клеточного (Т- и В-лимфоциты, макрофаги и др.) и гуморального (иммуноглобулины). Для возможности обмена информацией и, в последующем, координации действий иммунологической системы лимфоциты синтезируют белки-цитокины: интерфероны, интерлейкины и др. Количественная или функциональная недостаточность того или иного элемента иммунной системы приводит к возникновению иммунодефицитного состояния организма. Наиболее частым клиническими проявлениями иммунодефицитов являются рецидивирующие, затяжные, хронические, тяжело протекающие инфекции: бактериальные, вирусные, грибковые (Голощапова Е.Н., 1997).

Чаще всего иммунодефициты связываются с характерными для них изменениями крови: нейтропении, эозинофилии, анемии, тромбоцитопении. Но иногда проявляются сочетания и с другими осложнениями: гипоплазией клеточных элементов хрящей, волос, эктодермальной дисплазией, пороками сердца и крупных сосудов (Н.И. Ильина, Т.В.Латышева, Б.В. Пинегин, Н.У. Сетдикова, 2000).

С небольшой частотой встречаются врожденные иммунодефициты. Они, как правило, обусловлены мутациями специфических генов иммунологического ответа. Вторичный иммунодефицит — это клинико-иммунологический синдром, который развивается на фоне ранее стабильно функционирующей иммунологической системы. Данный иммунодефицит обуславливается устойчивым ярко выраженным снижением количественных и функциональных показателей норм специфических и/или неспецифических факторов иммунорезистентности. Среди многочисленных причин развития вторичного иммунодефицита следует указать главные, а именно: вирусные инфекции, в особенности те, что

поражают лимфоциты и макрофаги; немногочисленные бактериальные инфекции; ионизирующую радиацию; воздействие химических ядов и некоторых лекарственных препаратов (цитостатики, циклоспорины, глюкокортикостероидные гормоны); протозойные и глистные инвазии; дефицит в организме белка, витаминов и микроэлементов; неблагоприятные новообразования, почечную недостаточность, сахарный диабет, большую часть хронических заболеваний; алкоголизм, наркоманию, курение (Воробьев А.А., 2002).

Для восстановления полноценной работоспособности иммунологической системы применяют лекарственные препараты — иммуномодуляторы. Качество эффекта иммуномодуляторов в полной мере зависит от изначального состояния иммунитета пациента: данные лекарственные препараты способны понижать повышенные и повышать пониженные различные показатели иммунной системы. Свойствами иммуномодуляторов могут обладать соединения различной природы и химического строения: соединения микробного происхождения и их синтетические и полусинтетические аналоги; вещества животного происхождения (экстракты из тимуса, костного мозга, селезенки и др.); цитокины (например, интерфероны) и препараты, активизирующие их синтез в организме человека; препараты растительного происхождения (на основе эхинацеи, женьшеня и др.). В настоящее время получены также несколько синтетических соединений, которые оказывают выраженное воздействие на иммунологическую систему (азоксимера бромид, левамизол).

Вторичная иммунная недостаточность возникает у людей с изначально нормально функционирующей иммунологической системой. У таких людей могут поражаться Т-, В- и фагоцитарные элементы иммунитета, возможны их сочетания, что в дальнейшем приводит к снижению количества, функции и взаимодействия лимфоцитов и фагоцитов (Zschiesche W., Semenov B.F., Denner J., 1987).

Клинические проявления иммунодефицитов характеризуются недоброжелательными новообразованиями, аллергическими и аутоиммунными заболеваниями. У больных часто возникает ревматоидный артрит, системная красная волчанка (СКВ), склеродермия, системные васкулиты, тиреоидит, рассеянный склероз, хроническая почечная недостаточность, сахарный диабет 1 типа (Muller F., Haung C.J., Froland S.S., 1995).

Иммунодефицитами обозначают устойчивые изменения иммунного статуса, обусловленные дефектами одного или нескольких механизмов иммунного ответа. Различают несколько вариантов иммунодефицитов: врожденные (первичные), возрастные (физиологические) - в раннем детстве, старческом возрасте, приобретенные (вторичные), инфекционные (вирус-индуцированные) (Zschiesche W., Semenov B.F., Denner J., 1987).

В основе первичных иммунодефицитов, или первичной иммунной недостаточности лежит генетически предрасположенная неспособность организма осуществить какие-либо элементы иммунного ответа. Они проявляются на ранних этапах еще в постнатальном периоде и наследуются по аутосомно-рецессивному типу (Хаитов Р.М., Пинегин Б.В., Чередеев А.Н., 1998).

Приобретенные иммунодефициты строятся под влиянием окружающей среды на уровне фенотипа, в то время как врожденная иммунная недостаточность генетически запрограммирована и проявляется на уровне генотипа. Не у всех врожденных иммунодефицитов есть характерные для них маркеры, в некоторых случаях приобретенная иммунная недостаточность вызывает латентно протекающей вирусной инфекцией. В случае с вирусной инфекцией трудно решить, характеризуется ли данный иммунодефицит генетически или он возникает в организме сразу после рождения. Вторичные иммунодефициты встречаются намного чаще, чем врожденные.

Иммуноглобулины играют наиважнейшую роль в устранение бактерий и других инфекционных микроорганизмов. Они также благоприятно воздействуют на реализацию опсонизирующего эффекта.

Недостаток иммуноглобулинов сопровождается рецидивирующими и хроническими инфекциями разного рода происхождения, в том числе вызванными слабыми условно-патогенными возбудителями. В основном поражаются дыхательная система (бронхоэктазы, фиброз легких), ЖКТ (с диареями, нарушенным всасыванием), придаточные пазухи носа, мозговые корковые оболочки. Инфекции протекают с тяжелыми отравлениями, и зачастую осложняются септициемией (Стефани Д.В., Вельтщев Ю.Е., 1996). Недостаток иммуноглобулинов может протекать в виде тотальной гипогаммаглобулинемии или со снижением уровня одного класса или подкласса специфических пептидов (Петров Р.В., Хаитов Р.М., Пинегин Б.В., 1997).

Дефициты клеточного иммунитета могут проявляются с развитием инфекций по типу внутриклеточного паразитирования с соответствующим для него возбудителем (туберкулез, лепра, бруцеллез, вирусные инфекции, микозы). При менее сильных дефицитах клеточного иммунитета чаще всего развиваются персистирующие или рецидивирующие вирусные инфекции. Более сильная недостаточность проявляется микозами. Именно на фоне иммунодефицита можно встретить такие инфекции, как туберкулез, бруцеллез (Першин Б.Б., 1994).

Недостаточностью клеточного иммунитета можно объяснить возникновение заболеваний, вызванных простейшими. При этом само заболевание может не отражаться существенно на состоянии пораженного организма (лямблиоз, трихомониаз) или наслаиваться только на ярко выраженные дефициты клеточного иммунитета (токсоплазмоз, пневмоцистоз). Подавляющее большинство простейших, гельминтов и других инвазирующих паразитов сами обладают иммуносупрессорными воздействием (Покровский В.И., Гордиенко С.П., Литвинов В.И., 1994).

Модуляцией (коррекция) — это стимуляция заниженных и подавление завышенных значений показателей иммунитета. Существуют 4 основных направления иммуномодуляции:

1. коррекция гормонами и медиаторами иммунологической системы (тимические факторы, миелопептиды, цитокины типа интерферона, факторов переноса, ИЛ, колониестимулирующих факторов, факторов взаимодействия лимфоцит-макрофаг и др.);
2. иммунная инженерия (трансплантация органов и тканей иммунологической системы: костный мозг, клетки эмбриональной печени, тимуса, комплекс тимус-грудина и т.д.), введение γ -глобулинов или иммуноглобулинов отдельных классов, плазмы крови);
3. коррекция иммуностимуляторами природного происхождения (вакцины, ЛПС, бактериальные смеси, а также различные химически синтезированные препараты - левамизол, диуцифон, полианионы, изоприназин и др.);
4. использование лазерного и ультразвукового облучения, сорбционные методы, плазмаферез и др.

Список таковых иммуномодуляторов иммунитета в настоящее время превышает около 200 наименований и не перестает увеличиваться. Стоит отметить что, общепринятой классификации иммуностимулирующих препаратов пока нет (Манько В.М., Петров Р.В., Хаитов Р.М., 2002). По происхождению иммуномодуляторы могут быть из растительного, микробного, животного сырья или синтетические (Кузнецов В.П., Беляев Д.Л., Бабаянц А.А., 1996).

Существует определенный ряд требований к иммунокорректорам, а именно: минимальная активность; не вызывать побочных воздействий на организм, в том числе и недоброкачественную регенерацию клеток, и не потенцировать их свойств у других лекарственных препаратов; не вызывать аллергии и не возбуждать аутоиммунные реакции; легко

усваиваться и выводиться из организма; совместимость с другими лекарственными препаратами; предпочтительно пероральный способ применения, природное происхождение. (Караулов А.В., 1999).

1.5. Роль лейкоцитарных показателей в иммунитете

Лейкоцитарная формула (лейкоформула) - включает в себя определение относительного процентного количества нейтрофилов, лимфоцитов, эозинофилов, базофилов, моноцитов.

Изучение лейкоформулы имеет важное значение в диагностике гематологических, инфекционных, воспалительных заболеваний, а также при оценке тяжести состояния пациента и эффективности того или иного лечения. В это же время, малозначительные изменения лейкоформулы не всегда являются специфическими, а имеет особенности, связанные с возрастом.

По морфологическим критериям принято выделять основные виды лейкоцитов: нейтрофилы, моноциты, эозинофилы, лимфоциты, базофилы, плазматические клетки. Кроме этого, лейкоциты также различают по степени зрелости. Важно знать, что клетки-предшественники зрелых форм (юные, миелоциты, промиелоциты, бластные формы) могут появиться в периферической крови только при патологии.

Лейкоцитарная формула

Форменные элементы (40% от крови):

96% - *эритроциты* - могут переносить кислород и углекислый газ;

3% - *лейкоциты* - это клетки иммунологической системы;

1% - *тромбоциты* - они способствуют свёртыванию крови.

Эритроциты (красные кровяные тельца) — это высокоспециализированные клетки. У человека в эритроцитах не имеется ядер. Эритроциты содержатся у здорового человека в количестве $4,5 \cdot 10^6$ -

$5 \cdot 10^6$ в 1 мм^3 крови. Они представляют собой клетки, по форме напоминающие двояковогнутый диск. В цитоплазме эритроцитов содержится красящее их белковое вещество - *гемоглобин*, который, собственно, и обуславливает красный цвет крови. Главная функция эритроцитов состоит в том, что они являются транспортным переносчиком кислорода. Когда кровь проходит через лёгкие, гемоглобин эритроцитов поглощает кислород; после этого насыщенная кислородом (артериальная) кровь начинает разноситься по всему организму. В органах и их клетках кислород отделяется от гемоглобина и поступает в ткани. Гемоглобин в свою очередь участвует в переносе углекислоты из тканей в лёгкие, где эта кислота переходит из крови в воздух и выходит из организма в процессе дыхания. Большая часть углекислоты транспортируется в составе плазмы крови.

Количество эритроцитов всегда меняется от внешних факторов: мышечной работы, образа жизни, биоритмов эмоций, потери жидкости (концентрация эритроцитов повышается). Патологическое увеличение количества эритроцитов – эритроцитоз, а уменьшение количества – эритропения.

Большая часть эритроцитов образуются в красном костном мозге (около 10^7 ежесекундно). Такое пополнение крови эритроцитами крайне необходимо, так как продолжительность их жизни не превышает за частую 120 дней. Разрушение устаревших эритроцитов происходит в клетках мононуклеарной фагоцитарной системы (селезёнка, печень и др.).

Лейкоциты – это белые кровяные тельца, берущие свое начало из родоначальных стволовых клеток костного мозга. Лейкоциты отличаются от эритроцитов присутствием в них ядра, и способностью к активному самостоятельному движению. Они способны выходить из кровяного русла и возвращаться в него обратно. В крови здорового человека лейкоцитов приблизительно в 500 раз меньше, чем эритроцитов, всего $(4,0-9,0) \cdot 10^9/\text{л}$. Их суточное количество непостоянно и значительно колеблется в течение

дня, в связи с различными окружающими организм факторами. Меньше всего в крови лейкоцитов утром, натошак и увеличивается после приема еды (пищеварительный лейкоцитоз); а также во время мышечной работы, и сильных эмоций (например, переживаний) может достигать $1,1 \cdot 10^9/\text{л}$.

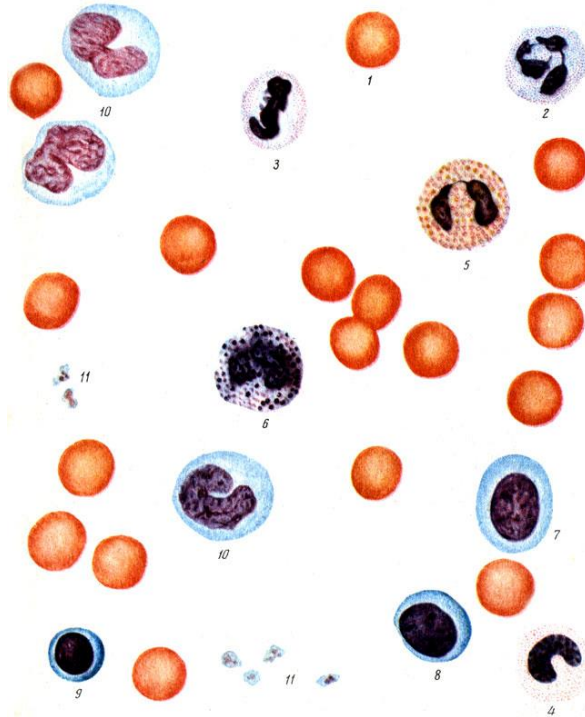


Рисунок 4. Форменные элементы крови. 1 - эритроцит; 2 - сегментоядерный нейтрофил; 3 - палочкоядерный нейтрофил; 4 - юный нейтрофил; 5 - эозинофил; 6 - базофил; 7, 8, 9 - лимфоциты; 10 - моноциты; 11 - кровяные пластинки (тромбоциты) (1967 Татаринов В Г - Анатомия и физиология)

Принято различать 5 видов лейкоцитов: эозинофилы (1-4% от числа всех лейкоцитов), нейтрофилы (60-70%), базофилы (0-0,5%), лимфоциты (25-30%) и моноциты (6-8%). Лейкоциты между собой неодинаковы по величине, форме ядер, свойствам цитоплазмы и функциям. Диаметр их варьируется от 6 до 25 мкм. По присутствию в цитоплазме зернистости лейкоциты делят на зернистые (гранулоциты) и незернистые (агранулоциты).

Гранулоциты: нейтрофилы, эозинофилы и базофилы - имеют в цитоплазме большое количество данных гранул, которые могут

окрашиваться разными красителями. В гранулах, как правило, содержатся ферменты, которые необходимы для активации внутриклеточного переваривания чужеродных агентов. Ядра всех гранулоцитов поделены на 2-5 частей, но соединённых между собой нитями. Поэтому их также называют *сегментоядерными* лейкоцитами. Молодые формы нейтрофилов с ядрами в форме палочек называются палочкоядерными, а в форме овала - юными.

К агранулоцитам относят лимфоциты и моноциты. Лимфоциты, по размеру самые маленькие из лейкоцитов, но имеют большое округлое ядро, окруженное тонкими ободком цитоплазмы. Самые крупные агранулоциты – это моноциты - имеющие ядро в виде боба или овала. (1988 Воробьева Е А Губарь А В Сафьянникова Е Б - Анатомия и физиология: Учебник)

Функциями лейкоцитов являются:

1. Проникновение через стенку сосудов и выход за пределы очага воспаления.
2. Фагоцитоз - процесс поглощения и дальнейшего переваривания микроорганизмов.
3. Лейкоциты синтезируют лейкины, которые приводят к уничтожению бактерий и нейтрализации их токсинов.
4. Лейкоциты формируют иммунитет.

Лейкоцитарная формула — как уже было сказано выше, это примерное соотношение лейкоцитов в крови. Используется в основном в диагностических целях. На Таблице № 1 приведена схема лейкоцитарной формулы человека.

Таблица 1 - Лейкоцитарная формула (1988 Воробьева Е А Губарь А В Сафьянникова Е Б - Анатомия и физиология: Учебник)

Лейкоциты, $10^9/\text{л}$	Эозинофилы, %	Базофилы, %	Нейтрофилы, %			Лимфоциты, %	Моноциты, %
			юные	палочкоядерные	сегментноядерные		
4,0-9,0	1-4	0-0,5	0-1	2-5	55-68	25-30	6-8

При некоторых заболеваниях можно заметить характерные для них изменения соотношения отдельных форм лейкоцитов. Например, при наличии глистов ярко увеличивается число эозинофилов, а при воспалениях возрастает число нейтрофилов. При туберкулёзе, как правило, отмечают увеличение количества лимфоцитов. Почти всегда лейкоцитарная формула меняется в течение заболевания. В острый период инфекционного заболевания, при тяжёлом течении болезни эозинофилы могут не обнаруживаться в крови вообще, а с началом выздоровления, ещё до видимых признаков улучшения состояния больного, они очень отчётливо видны под микроскопом. (1976 Физиология человека)

Стоит отметить также, тромбоциты, или кровяные пластинки, представляющие собой бесцветные сферические, лишённые ядер тельца. Их диаметр небольшой - 2-3 мкм, можно сказать в 3 раза меньше диаметра эритроцитов. Тромбоциты также образуются в красном костном мозге и селезёнке. Но продолжительность их жизни около 4 дней. Разрушение тромбоцитов происходит также в селезёнке. Число тромбоцитов в крови примерно $300,0 \cdot 10^9/\text{л}$. Значительная часть их депонирована в селезёнке, печени, лёгких и в случае резкой необходимости поступает в кровь. Приём пищи или мышечная работа могут повысить содержание тромбоцитов в крови. (1976 Физиология человека, 1988 Воробьева Е А Губарь А В Сафьянникова Е Б - Анатомия и физиология: Учебник)

Главная функция тромбоцитов связана с их непосредственным участием в свёртывании крови. При повреждении кровеносных сосудов тромбоциты разрушаются. При этом из их цитоплазмы выходит в плазму вещества, необходимые для формирования кровяного сгустка – так называемого тромба. Как правило, формирование тромба сопровождается сужением кровеносных сосудов. Данному эффекту способствует выделяющееся при разрушении кровяных пластинок специальное сосудосуживающее вещество. (1976 Физиология человека)

ГЛАВА II. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Материалы исследований

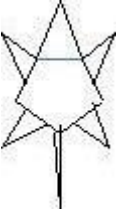
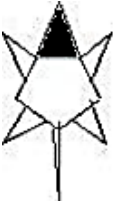
2.1.1. Лабораторные животные

Данный эксперимент проводился на белых беспородных мышах мужского пола массой от 20 до 30г. Влияние фракций ЛПС исследовалось после предварительной однократной инъекции цитостатика циклофосфана (50мг/кг) внутривентрально. Введение фракций ЛПС и препарата сравнения производилось спустя сутки после реализации иммунодефицита и в последующем ежедневно в течение 21 дня. На 21-ый день проводился забор крови, паренхиматозных органов и сердца мышей.

Мыши были разбиты на экспериментальные группы и маркированы пикриновой кислотой в соответствии со схемой Таблица № 2

Животных содержали в пластмассовых клетках на деревянных опилках (площадь клеток 1125 см²). В качестве питания мыши получали стандартный корм и воду без ограничения, они содержались при температуре 20 – 25⁰ С и 65% влажности воздуха со сменой светового режима через каждые 12 часов. Содержание мышей, забор крови и органов проводилось в соответствии с положением работы с животными, принятым в НИИЭМ, которое полностью соответствует аналогичным Положениям в России (МЗ РФ от 19 июня 2003 г. №267).

Таблица 2- Маркировка лабораторных мышей в эксперименте

№ 1 ИНТАКТНЫЕ (через зонд ничего не вводится) <u>Кол-во: 10</u>	№ 2 КОНТРОЛЬ (Введение воды) <u>Кол-во: 10</u>	№ 3 ГР.СРАВН. (Ликопид – 0,1 мл) <u>Кол-во: 10</u>	№ 4 ОПЫТ (ЛПС -1) <u>Кол-во: 10</u>	№ 5 ОПЫТ (ЛПС-2) <u>Кол-во: 10</u>
				

2.1.2. Препарат создания модели иммунодефицита

Перед введением фракций ЛПС у лабораторных мышей был спровоцирован иммунодефицит. Для создания данного условия внутрибрюшинно вводился цитостатик циклофосфан (циклофосфамид) в дозе 50 мг/кг. Далее ежедневно внутрибрюшинно вводили в соответствующих группах мышей водили фракции липополисахаридов в дозе 10 пг/мл. Через 21 день проводился забор крови, паренхиматозных органов и сердца лабораторных мышей для последующего проведения органомерии.

Циклофосфан относится к алкилирующим препаратам, которые из большого числа противоопухолевых препаратов получил наиболее широкое применение (Блохин Н.Н., 1984). По химической структуре циклофосфан является циклическим фосфорилированным производным азотистого иприта. Опираясь на классификацию ВОЗ, иприты относятся к веществам как смертельного воздействия, так и к инкапситуантам калечащего воздействия (Куцепко С.А., 2004).

Применение циклофосфана лимитировано в связи с широким спектром побочных эффектов. Токсическое воздействие высоких доз ЦФ по экспериментальным данным обуславливается в подавление общего состояния лабораторных животных, снижении массы и волосяного покрова, хронической усталости и апатии, нарушении функции ЖКТ, ухудшение гемопоэза, в частности лейко- и лимфопоэза (С. А. Гиллер, 1965).

Циклофосфан действует на лейкоциты на всех этапах их созревания. Лейкоциты для продолжения дифференцировки должны исправлять химические повреждения и возникшие двуцепочечные разрывы, которые образуются вследствие остановки репликативной вилки, которые наталкиваются на препятствия, представляющие из себя сшивки цепей ДНК. Двухцепочечные разрывы нити ДНК хромосомы являются смертельным повреждением, которые в дальнейшем активируют клеточные процессы, направленные на его репарацию.

При введении циклофосфана в токсических дозах были обнаружены серьезные и устойчивые изменения во всех ростках кроветворения лабораторных мышей. Общее количество лейкоцитов снижается больше чем наполовину в первые 5 суток, а к десятому дню - на 70-80%. Наиболее чувствителен к циклофосфану лимфопоэз, но со стороны эритропоэза и тромбоцитопоэза наблюдались не существенные изменения (Белоусова А.К., 1977). При введении большой разовой дозы лейкопения проявляется через 7-14 дней и удерживается еще 3-10 дней (Гершанович МЛ., 1982).

Механизм повреждений гемопоэза при использовании ЦФ связан большей частью с тем, что этот препарат провоцирует множественные двуцепочечные разрывы в ДНК кроветворных клеток. Данный процесс приводит к мутациям, хромосомным абберациям и, в конечном итоге, к летальному исходу клеток (Попова Н. А., 2006).

После того, как клетка опознает повреждение, активизируется система передачи сигнала, которая включает в себя трансдуцирующие

киназы. Сигнальные киназы возбуждают каскад молекулярных процессов, которые определяют арест клеточного цикла и активизацию репаративных систем. В итоге, включается система репаративной гомологичной рекомбинации, которая использует для репарации донорные последовательности сестринской хроматиды или гомологичной хромосомы. Однако при наличии большого числа повреждений, вызванных ЦФ, возникают стерические препятствия для функционирования процесса рекомбинации или сказывается дефицит репаративных комплексов, которые осуществляют репарацию, и клетка в конечном счете оказывается неспособной устранить возникшие повреждения и запускается апоптоз (Николин В. П., Попова Н. А., Себелева Т. Е., 2006).

2.1.3. Препарат группы сравнения

В качестве контрольного препарата сравнения иммуностимулирующей активности был использован липопид, который является синтетическим аналогом бактериальных гликопептидов и относящийся к фармакотерапевтической группе - иммуномодуляторы.

Липопид – это глюкозаминил-мурамил-дипептид, представляющий собой главную структурную единицу пептидогликана клеточной стенки бактерий. Этот препарат воздействует на клетки врожденной иммунной системы, связываясь со специфическим рецептором. Активизирует стимуляцию эффекторных функций фагоцитов (освобождение активных форм кислорода, лизосомальных ферментов, представление антигенов) и продукцию провоспалительных цитокинов, которые, в свою очередь, индуцируют пролиферацию, активацию и дифференцировку клеток приобретённого иммунитета, а именно Т- и В-лимфоцитов. Данный процесс происходит через усиление продукции колониестимулирующих факторов. В результате воздействия данного препарата происходит

активация всех элементов иммунологической системы с усилением противомикробного и противоопухолевого иммунитета. Ликопид после перорального введения быстро и хорошо всасывается в организм мышей. Максимально превышающая концентрация в плазме неизменного ГМДП можно выявить через 4 часа. Доступность составляет около 77 %. Из организма мышей полностью выводится через 8 часов. Продукты метаболизма имеются в кровотоке в течение 12 часов и выводятся, через почки с мочой. По степени воздействия на организм глюкозаминилмурамилдипептид относится к малоопасным веществам (4 класс опасности). ГМДП не оказывает тератогенного и мутагенного воздействия на организм мышей. Не оказывает раздражающего и сенсибилизирующего действия.

Биологическая активность ликопида характеризуется присутствием специфических центров связывания (рецепторов) к ГМДП, находящихся в эндоплазме фагоцитов и Т- лимфоцитов. Ликопид повышает функциональную (бактерицидную, цитотоксическую) активность фагоцитов (нейтрофилов, макрофагов), улучшает пролиферацию Т- и В-лимфоцитов, усиливает образование специфических антител. Фармакологическое действие реализуется посредством усиления выработки интерлейкинов (интерлейкина-1, интерлейкина-6, интерлейкина-12), фактора некроза опухолей-альфа, гамма-интерферона, колониестимулирующих факторов. Также он стимулирует активность естественных киллерных клеток (Першин Б.Б., 1994).

Препарат может применяться как для взрослых, так и детей для комплексной терапии общего состояния организма.

При химиотерапии ликопид принимают по 10-20 мг 1 раз в сутки в течение 10 дней. То есть – 0,14-0,28 мг\кг при весе 70 кг.

Расчет для мышей при дозировке 0,17 мг\кг:

1. Средний вес мыши 30 г. Необходимо $30 \times 0,17 \div 1000 = 0,005$ мг.

2. Для этого таблетку 1 мг развели в 20 раз (0,05 мг в 1 мл).

3. Свежеприготовленный раствора (0,005мг) вводился мышам по 0,1мл.

2.1.4. Фракции липополисахаридов *Pseudomonas aeruginosa*

Фракции ЛПС *Pseudomonas aeruginosa* были получены и любезно предоставлены для постановки эксперимента с.н.с., к.б.н. Гарафутдиновым Р.Р. (зав. лабораторией физико-химических методов исследования биополимеров ФГБУН ИБГ УНЦ РАН).

2.2. Методы исследований

2.2.1. Взвешивание органомерических характеристик паренхиматозных органов

Орган вполне можно рассматривать как многоуровневую иерархическую систему, в которой между всеми морфологическими уровнями существуют устойчивые структурно-функциональные взаимодействия. Результаты органомерического анализа требуются для установления общих характеристик всех его структурно-функциональных частей (Юшков Б.Г., Черешнев В.А., 2016).

Во время проведения органомерических исследований следует учитывать два важных момента. Результаты полученные при органомерическом анализе могут быть применены для выявления общей картины наблюдаемого явления. Кроме того, органомерические исследования является лишь одним из этапов полноценного системного исследования, когда устанавливаются морфологические связи между структурно-функциональными элементами одного уровня исследования с последующим определением межуровневых соотношений.

Массовый коэффициент (МК) — это процентное отношение массы органа к массе тела. Он является интегральным показателем, который используется в токсикологии для оценки состояния внутренних органов.

Таблица 3 - Весовые индексы паренхиматозных органов и сердца белых лабораторных мышей (Юшков Б.Г., Черешнев В.А., 2016)

Вид животных	Селезенка (г)	Печень (г)	Почки (г)	Сердце (г)
Мышь белая	0,152±0,0031	0,360±0,114	0,33±0,021	0,12±0,0007

Органы, извлеченные при некропсии, взвешивают влажными, незамедлительно, после проведения некропсии, чтобы избежать их высыхания, парные органы взвешивают вместе. Расчет МК выполняют по формуле: $МК = \text{Масса органа (г)} / \text{масса тела (г)} * 100\%$.

Оценка части той или иной структурной составляющей органа на макроскопическом уровне анализа с применением метода взвешивания зарисовок дает небольшую погрешность случайного и систематического характера, которые связаны с различной плотностью бумаги даже в одном листе, а также с погрешностями в выполнении зарисовок, их вырезания и взвешивания. Данные погрешности плохо поддаются учету, вследствие чего тяжело установить правильную величину необходимых поправок. Метод линейного интегрирования, несмотря на свою простоту, не несет четкого математического результата, а для применения данного метода требует специальное оборудование.

Вышеуказанных недостатков лишен метод «полей». Он вытекает из основных положений теории вероятностей и математической статистики, поэтому результаты исследований всегда могут быть проконтролированы и доведены до требуемой степени точности.

Для применения этого метода на практике нет никакой нужды в каком-либо специальном оборудовании, а необходимые тестовые сетки с равномерно удаленными друг от друга точками могут быть изготовлены самостоятельно. Метод «полей» достаточно эффективен и экономичен, при достаточном навыке на весь процесс исследования, включая и

статистическую обработку материала, для разового случая обычно уходит не больше 20 мин (Салтыков А.И., 1978). Но только в том случае, когда часть исследуемой структурной составляющей органа довольно низка, потери времени увеличиваются.

Метод «полей» состоит в «замене» объема (поверхности) органа соответствующим числом точек пространственной или плоскостной решетки, с одновременной заменой объема данного структурного компонента соответствующим ему числом точек взвешенной в органе пространственной решетки, с последующей оценкой доли всех точек решетки, которые приходятся на данный структурный компонент. Метод полей эффективен и экономичен, при хорошем навыке на весь процесс исследования, включая и статистическую обработку материала, для одного случая обычно затрачивается не более 20 мин (Салтыков А.И., 1978).

Исследования на плоскостных препаратах происходит следующим образом. На поверхность исследуемого органа накладывается сетка с решеткой, имеющая равноудаленные друг от друга точки (рис. 12) и производят дифференцированный подсчет числа этих точек, приходящихся отдельно на каждую структурную составляющую органа. Полученные показатели обрабатывают методами альтернативной статистики с расчетом дисперсии, среднего квадратического отклонения и ошибки. В том случае, когда поставлена цель определения долевого вклада в величину плоского органа с очагами патологии, то такой очаг принимается за один из структурных составляющих органа и дифференцированно устанавливают число приходящихся на него точек.

Требуемого числа подсчетов точек для получения достоверных данных в 95% доверительном интервале получают либо увеличением плотности точек в решетке, при этом уменьшая расстояние между ними, либо же повторными наложениями одной и той же решетки на исследуемый орган. Второму методу следует отдать предпочтение, особенно в тех ситуациях, когда увеличение плотности точек в

планиметрической решетке может привести к повышению нагрузки на глаза, что в последствие может привести к ухудшению работоспособности зрительного аппарата и снижением производительности труда.

Исследование этого показателя при токсикологических анализах, дает возможность выявления органа-мишени токсиканта, обнаружить признаки эндокринно-связанных эффектов (Юшков Б.Г., Черешнев В.А., 2016).

2.2.2. 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 -Количественный состав форменных элементов крови (Б.Г. Юшков, В.А. Черешнев, 2016)

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

2.2.3. Статистическая обработка

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

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

U-критерий Манна-Уитни – это непараметрический статистический критерий, применяемый для сравнения 2 независимых выборок по уровню

какого-либо признака, который измерялся количественно. Метод основан на выявление того, достаточно ли мала зона перекрещивающихся значений между двумя вариационными рядами (ранжированным рядом значений параметра в 1-ой выборке и таким же во 2-ой выборке). Чем меньше показатель критерия, тем вероятнее, что различия между показателями параметра в выборках достоверны.

U-критерий больше подходит для сравнения малых выборок: в каждой из выборок должно быть не меньше трех значений признака. Разрешается, чтобы в одной выборке было два значения, но в другой тогда должно быть не меньше 5.

Критерием для использования U-критерия Манна-Уитни является обязательное отсутствие в сравниваемых группах совпадающих значений признака (все числа – разные) или хотя бы очень низкое число таких совпадений (Сидоренко Е. В., 2001).

ГЛАВА III. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. Анализ органомерических характеристик паренхиматозных органов при иммунодефиците и на фоне применения фракций липополисахаридов *Pseudomonas aeruginosa*

Результаты исследований органомерических характеристик органов при иммунодефиците и на фоне использования фракций ЛПС *Pseudomonas aeruginosa* представлены в таблице 5.

Из данных таблицы важным следует отметить, что селезенка иммунодефицитных мышей сильно увеличивалась под воздействием циклофосфана (на 40%), но под воздействием исследуемых ЛПС не увеличивается, что говорит о подавлении реактивности лимфатико-макрофагальной системы.

Увеличение размеров сердца под воздействием данной химиотерапии в группе мышей, не принимающих фракции ЛПС *Pseudomonas aeruginosa*, говорит о токсическом влиянии алкилирующего цитостатика, обусловленным декомпенсаторными процессами в системе кровотока. В это же время, при использовании ЛПС *Pseudomonas aeruginosa*, наблюдаются такие же процессы декомпенсации сердечно-сосудистой системы.

Но стоит сделать поправку, что большая часть полученных результатов не показали статистическую достоверность по критерию Манна-Уитни, и потому требуется продолжать исследования действия ЛПС *Pseudomonas aeruginosa* на иммунитет.

Таблица 5 - Результаты органомерических показателей на фоне использования фракций ЛПС *Pseudomonas aeruginosa*.

Показатель	Группы мышей				
	1 (n=10)	2 (n=10)	3 (n=10)	4 (n=10)	5(n=10)
	Контроль интактные	Контроль б/лечения	Ликопид	ЛПС-1	ЛПС-2
Селезенка					
M±σ	0,16±0,07	0,22±0,07	0,12±0,04	0,15±0,05	0,16±0,07
Me	0,15	0,2	0,12	0,15	0,16
[Q1-Q3]	[0,1-0,2]	[0,2-0,3]	[0,1-0,1]	[0,1-0,2]	[0,1-0,2]
		P ₁₋₂ =0,7	P ₂₋₃ =1	P ₂₋₄ =1	P ₂₋₅ =1
Сердце					
M±σ	0,1±0,01	0,11±0,03	0,11±0,03	0,12±0,04	0,11±0,03
Me	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
[Q1-Q3]	[0,1-0,1]	[0,1-0,1]	[0,1-0,1]	[0,1-0,1]	[0,1-0,1]
		P ₁₋₂ =0,754	P ₂₋₃ =0,251	P ₂₋₄ =0,14	P₂₋₅=0,047
Печень					
M±σ	1,17±0,36	1,31±0,36	1,35±0,28	1,44±0,29	1,35±0,35
Me	1,1	1,3	1,3	1,4	1,3
[Q1-Q3]	[1 -1,4]	[1,1-1,6]	[1,1-1,7]	[1,3-1,7]	[1,2-1,4]
		P ₁₋₂ =0,273	P ₂₋₃ =0,940	P ₂₋₄ =0,307	P ₂₋₅ =0,91
Почки					
M±σ	0,24±0,05	0,26±0,07	0,23±0,05	0,23±0,07	0,23±0,05
Me	0,2	0,25	0,2	0,2	0,2
[Q1-Q3]	[0,2-0,3]	[0,2-0,3]	[0,2-0,3]	[0,2-0,3]	[0,2-0,3]
		P ₁₋₂ =0,597	P ₂₋₃ =0,385	P ₂₋₄ =0,31	P ₂₋₅ =0,385

Нами было обнаружено и охарактеризовано, патологическое действие ЛПС *Pseudomonas aeruginosa* на лабораторных животных (белых мышях). Установлено и зафиксировано, что при искусственном индуцировании экспериментального иммунодефицита циклофосфаном и дальнейшего его инъектирования фракций ЛПС-1 и ЛПС-2 у лабораторных мышей 2-5 групп паренхиматозные органы и сердце претерпели изменения, которые отображены и приведены в Таблице 5. Данные исследовательские результаты были получены после лабораторной аутопсии мышей всех 5 групп. Паренхиматозные органы и сердце мышей 1 группы обозначались контролем при взвешивании и анатомическом сравнении с органами мышей из других групп, а также при сравнении выраженных патологических изменений органов. У мышей 2 группы был вызван иммунодефицит циклофосфаном, но лечения ликопидом не проводилось. 3-ая экспериментальная группа, единственная группа, которая была

инъецирована ликопидом. Аутопсия, визуальная оценка и непосредственное взвешивание органов 3-ей группы мышей показало, что паренхиматозные органы и сердце не претерпели существенных изменений, что может свидетельствовать об эффективности лечения данным препаратом. В группах мышей под номер 4 и 5 был вызван иммунодефицит фракциями ЛПС *P. aeruginosa* 1 и 2 соответственно. Внутренние органы мышей претерпели изменения, особенно сердце мышей 5 группы

Таким образом, можно сделать вывод, что использование ЛПС патогенных грамотрицательных бактерий (*Pseudomonas aeruginosa*), является не доказанным при цитостатической терапии, так как они обладают ярко выраженными гепатотоксичными и нефротоксичными признаками, а также способностью подавлять иммунную систему и кровообращения.

3.2. Анализ количественного состава форменных элементов крови при иммунодефиците и на фоне применения фракций липополисахаридов *Pseudomonas aeruginosa*

Таблица 6- Влияние липополисахарида и фракций ЛПС *Pseudomonas aeruginosa* на количественный состав форменных элементов крови

Показатель	1 (n=12)	2 (n=12)	3 (n=12)	4 (n=12)	5 (n=12)
	Контроль интактные	Контроль после лечения	Липолипид	ЛПС-1	ЛПС-2
Базофилы					
M±σ Me/[Q1-Q3]	1,25±0,76 0,3/[1,04-1,92]	0,6±0,51 0,8/[0,6-0,9] p₁₋₂=0,004	2,1±0,65 2/[1,7-2,7] p₂₋₃=0,0003 p ₁₋₃ =0,1	1,8±0,5 1,9/[1,3-2,3] p₂₋₄=0,0003 p ₁₋₄ =0,19	1,7±0,6 1,8/[1,2-2,2] p₂₋₅=0,0009 p ₁₋₅ =0,3
Эозинофилы					
M±σ Me/[Q1-Q3]	2,5±1,25 2,7/[1,7-3,1]	1,7±0,58 1,7/[1,2-1,9] p ₁₋₂ =0,076	1,9±0,87 2,1/[0,9-2,6] p ₂₋₃ =0,82 p ₁₋₃ =0,2	2,4±0,8 2,2/[2,1-2,5] p ₂₋₄ =0,05 p ₁₋₄ =0,57	3,3±0,55 3,5/[2,85-3,8] p₂₋₅=0,0003 p ₁₋₅ =0,11
Палочкоядерные					
M±σ Me/[Q1-Q3]	2,6±1,14 2,4/[1,75-3,6]	1,9±0,45 1,9/[1,8-2,3] p ₁₋₂ =0,21	1,57±0,57 1,6/[1,3-2,1] p ₂₋₃ =0,17 p ₁₋₃ =0,021	2,1±0,79 2,1/[1,5-2,6] p ₂₋₄ =0,55 p ₁₋₄ =0,29	2,4±0,86 2,4/[2,1-2,9] p ₂₋₅ =0,09 p ₁₋₅ =0,082
Сегментоядерные					
M±σ Me/[Q1-Q3]	22,1±6,87 22,9/[15,4-27,8]	15,1±5,19 16/[11-19,2] p ₁₋₂ =0,04	18,9±3,88 19,2/[17,7-21,7] p ₂₋₃ =0,08 p ₁₋₃ =0,38	25,1±5,53 24,7/[20,7-30,1] p₂₋₄=0,001 p ₁₋₄ =0,41	29,3±3,87 30,2/[26,3-32,7] p₂₋₅=0,002 p ₁₋₅ =0,02
Лимфоциты					
M±σ Me/[Q1-Q3]	75,1±6,7 76/[70,2-80,7]	61,2±4,45 60,2/[59-64,6] p₁₋₂=0,0004	77±8,32 76,8/[73,6-79,7] p₂₋₃=0,0002 p ₁₋₃ =0,65	77,9±5,76 77,2/[74,1-80] p₂₋₄=0,0002 p ₁₋₄ =0,5	73,2±7 73/[68,5-79] p₂₋₅=0,002 p ₁₋₅ =0,65
Моноциты					
M±σ Me/[Q1-Q3]	2±1,1 2/[1-2,6]	0,9±0,6 0,9/[0,2-1,5] p ₁₋₂ =0,02	1,9±0,85 2,1/[1,1-2,3] p ₂₋₃ =0,007 p ₁₋₃ =0,79	2,9±1,1 2,6/[2,1-3,3] p₂₋₄=0,0002 p ₁₋₄ =0,09	2,1±0,86 2,2/[1,5-2,6] p ₂₋₅ =0,005 p ₁₋₅ =0,88

После проведения органомерического исследования, мы провели исследования лейкоформулы и опираюсь на полученные результаты,

приведенные в Таблице 6, мы можем утверждать, что соотношение относительного процентного количества лимфоцитов, эозинофилов, базофилов, нейтрофилов, моноцитов находились в состоянии отличного от нормы. Палочкоядерные нейтрофилы, единственные кровяные тельца, которые не претерпели существенных изменений и их показатели во всех экспериментальных группах варьировались в пределах нормы.

ВЫВОДЫ

После проведенных сравнительных анализов иммуностимулирующих свойств очищенных ЛПС бактерий *Pseudomonas aeruginosa* в эксперименте на лабораторных животных, следует сделать следующие выводы:

1. Использование фракций ЛПС *Pseudomonas aeruginosa* является оправданным и безопасным, так как уменьшает выраженность подавления иммунитета и функций паренхиматозных органов, о чем свидетельствуют результаты органомерических характеристик
2. Результаты исследований количественного состава форменных элементов крови на фоне вызванного иммунодефицита и после применения фракций ЛПС *Pseudomonas aeruginosa* показывают, что отдельные фракции ЛПС улучшают иммунологическую реактивность организма животных.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1.Онищенко Г.Г., Кутырев В.В., Кривуля С.Д., Федоров Ю.М., Топорков В.П. Стратегия борьбы с инфекционными болезнями и санитарная охрана территорий в современных условиях. Пробл. особо опасных инф. 2006; 92(2):5–9
- 2.Гурбанова С. Ф. Влияние бактериальных липополисахаридов на клеточный и гуморальный иммунитет у мышей, зараженных *S. Albicans* : Проблемы медицинской микологии .; 2007.
3. Куркин, Д.В., Арчакова, Ю.В., Волотова, Е.В., Бородкина, Л.Е. Иммуностропные препараты: Клинико-фармацевтические аспекты применения методическое пособие / Д.В. Куркин, Ю.В. Арчакова, Е.В. Волотова, Л.Е. Бородкина. – М.: ВолгГМУ, 2013. – 72 с.
4. Харченко Л.А. Медицина неотложных состояний. 2015. № 1 (64). С. 164-168.)
5. В.В. Зверев, профессора Бойченко. Микробиология/ Учебник. «ГОЭТАР-Медиа» Москва, 2012-572с
6. Татаринов В Г - Анатомия и физиология 1967 г.
7. Воробьева Е А Губарь А В Сафьянникова Е Б - Анатомия и физиология: Учебник 1988 г.
- 8.'Физиология человека'\Издание второе - Москва: Просвещение, 1976
9. (Егорова О.Н., Брусина Е.Б, Григорьев Е.В. «Эпидемиология и профилактика синегнойной инфекции» 11.2014)
10. Cigana C., Curcurù L., Leone M.R., Ieranò T., Lorè N.I., Bianconi I., et al. *Pseudomonas aeruginosa* exploits lipid A and mucopeptides modification as a strategy to lower innate immunity during cystic fibrosis lung infection. *PloS one* 2009; 4(12):e8439.

11. Meadow P. M. Wall and membrane structures on the genus *Pseudomonas* // Genetics and biochemistry of *Pseudomonas* / Ed. R. Clarke.— London ; New York : John Wiley and sons, 1975.— P. 67—98.

12. Wilkinson S. G. Cell walls of *Pseudomonas* species sensitive to ethylenediaminetetraacetic acid // J. Bacteriol.— 1970.— 104, N 3.— P. 1035—1044.

13. Gray G. W., Wilkinson S. G. The action of ethylenediaminetetraacetic acid on cell walls of some gram-negative bacteria // J. Gen. Microbiol.— 1965. — 39, N 3.— P. 385—399.

14. Wilkinson S. G. The sensitivity of pseudomonads to ethylenediaminetetraacetic acid // J. Gen. Microbiol.— 1967.— 47, N 1.— P. 67—76.

15. Weckesser P., Mayer H. Different lipid types in LPS of phototrophic and related nonphototrophic bacteria // FEMS Microbiol. Revs.— 1988.— 54, N 1.— P. 143—154

16. Drewry D. T., Lomax Y. A., Gray G. W., Wilkinson S. G. Studies of lipid A fractions from the lipopolysaccharides of *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas alcaligenes* // Biochem. J.— 1973.— 133, N 3.— P. 563—572

17. Luderitz O., Freudenberg M. A., Galanos C. et al. Lipopolysaccharides of gram-negative bacteria // Membrane lipids of procaryotes / Ed. S. Razin, S. Rottem. New York : Acad, press, 1982.— Vol. 17.— P. 79—151.

18. Kasai N., Arata S., Mashimo I. et al. *Pseudomonas dimiuta* LPS with a new endotoxic lipid A structure // Biochem. and Biophys. Res. Commun.— 1987.— 142.— P. 972—978

19. Книрель Ю. А. Липополисахариды грамотрицательных бактерий // Прогресс химии углеводов.— М.: Наука, 1985.— С. 54—76.

20. Веремейченко С. Н. Изучение липополисахаридов бактерий группы *Pseudomonas fluorescens* : Автореф. дис. ... канд. биол. наук.— Киев, 1988.— 22 с

21. Sawada S., Kawamura T., Masuho Y., Tomibe /(. A New common polysaccharide antigen of strains of *P. aeruginosa* detected with a monoclonal antibody //J. Infect. Diseases.— 1985.— 152, N 6.— P. 1290— 1299.
22. Yokota Sh., Kaya Sh., Sawada S. et al. Characterization of a polysaccharide component of LPS from *Pseudomonas aeruginosa* D 1008 (ATCC 27584) as D — rh a m n a n // Eur. J, Biochem.— 1987.— 167, N 1.— P. 203—209.
23. Jessen O. *Pseudomonas aeruginosa* and other green fluorescent pseudomonads.— Munksgaard, Copenhagen, 1965.— 240 p.
24. Fuerst J. A., Hayward A. Surface appendages similar to fimbriae (pili) von *Pseudomonas* species//J. Gen. Microbiol.— 1969.— 58, N 2 .— P. 227— 237.
25. Bradley D. A. Function of *Pseudomonas aeruginosa* polar pili: twitching motility // Can. J. Microbiol.— 1980.— 26, N 1.— P. 146— 154.
26. Buchanan T., Pearce W. Pathogenic aspects of outer membrane components of Gram -negative bacteria // Bacterial outer membranes, biogenesis and function.— New York : Wiley and Sons, 1979.— P. 475—514.
27. Hoffman H. P., Geftic S. C., Heumann H., Adair F. W. Mesosomes in *Pseudomonas aeruginosa*/ / J. Bacteriol.— 1973.— 114, N 2.— P. 434—438.
28. Young H. O., Chao F., Turnbull C., Philpott D. E. Ultrastructure of *Pseudomonas saccharophila* at early and late log phase of growth //J. Bacteriol.— 1972.— 109, N 2.— P. 862—868.
29. Forsyth W. G., Hayward A. C., Roberts J. B. Occurrence of poly-P-hydroxybutyric acid in aerobic gram -negative bacteria // Nature.— 1958.— 182, N 4638.— P. 800.
30. Holloway B. W., Morgan A. F. Genome organisation in *Pseudomonas*/ / Ann. Rev. Microbiol.— 1986.— 40.— P. 79— 105.
31. Блохина И. Н., Леванова Г. Ф. Геносистематика бактерий.— М.: Наука, 1976.— 150 с

32. Mandel M. Deoxyribonucleic acid base composition in the genus *Pseudomonas* // J. Gen. Microbiol.— 1966.— 43, N 3.— P. 273—292.

33. Kodama K., Kimura N., Komagata K. Two new species of *Pseudomonas*: *P. oryzihabitans* isolated from rice paddy and clinical specimens and *P. luteola* isolated from clinical specimens // Int. J. Syst. Bacteriol.— 1985.— 35, N 4.— P. 467—474

34. De Ley J. DNA-base composition and hybridization in the taxonomy of phytopathogenic bacteria // Ann. Rev. Phytopathol.— 1968.— 6.— P. 63—90.

35. Квасніков Є. І., Ісакова Д. М., Кіпріанова О. А. та ін. Бактерії роду *Pseudomonas*, що засвоюють етанол // Мікробіол. журн.— 1974.— 36, № 6.— С. 683—685.

36. Киприанова Е. А., Ставец-я С. С., Бойко О. И., Кривец И. А. Усвоение додецилсульфата натрия & бактериями рода *Pseudomonas* // Микробиол. журн.— 1978.— 40, № 4. ^ С. 503—505.

37. Sneath P. H., Collins V. G. A study in test reproducibility between Laboratories: report of a *Pseudomonas* working Party // Antoni van Leeuwenhoek J. Microbiol. and Scrol.— 1974.— 40, N 4.— P. 481—527.

38. Киприанова Е. А., Гарагуля А. Д., Леванова Г. Ф. и др. Штамм *Pseudomonas stutzeri*, неспособный к денитрификации // Там же.— 1983.— 45, № 2.— С. 88—90

39. Sherris J. S., Shoesmith J. G., Parker J. G., Breckon M. T. Tests for the rapid breakdown of arginine by bacteria: their use in the identification of *Pseudomonas* // J. Gen. Microbiol.— 1959.— 21, N 2.— P. 389—396.

40. Fothergill J. C., Guest J. R. Catabolism of ϵ -Lysine by *Pseudomonas aeruginosa* // J. Gen. Microbiol.— 1977.— 99, N 1.— P. 139—155.

41. Mann S. Taxonomic studies of tryptophan breakdown in *Pseudomonas aeruginosa* // Spisy Prirodoved fak. Univ. Brne — 1970.— N 1/6.— P. 27—35

42. Cox C. D., Parker J. Use of 2-aminoacetophenone production of *Pseudomonas aeruginosa* / J. Clin. • Microbiol.— 1979.— 9, N 4.— P. 479—484.
43. Mann S. Ober melaninbildende Stamme von *Pseudomonas aeruginosa* // Arch. Microbiol.— 1969.— 65, N 4.— P. 359—379.
44. Рожавин М. А. Биологические свойства меланинообразующих штаммов *Pseudomonas aeruginosa* : Автореф. дис. ... канд. биол. наук.— Киев, 1982.— 26 с
45. Wick M. M. L-DOPA methyl ester: Prolongation of survival of neuroblastom a-bearing mice after trea tm e n t/ / Science.— 1978.— 199, N 4330.— P. 775— 776.
46. Bengmark S. Gut microbiota, immune development and function. Pharmacological Research. 2013; 69(1): 87–113
47. Brandenburg K., Andra J., Müller M., Koch M.H.J., Garidelc P. Physicochemical properties of bacterial glycopolymers in relation to bioactivity // Carbohydr. Res. -2003. Vol. 338. - P. 2477 – 2489.
48. Brandenburg K., Jurgens G., Andra J., Lindner B., Koch M., Blume A., Garide P. Biophysical characterization of the interaction of high-density lipoprotein (HDL) with endotoxins // Eur.J. Biochem. 2002. V. 269, N.23. P.5972-5981.
49. Cronan G.E., Keating D.H. Sinorhizobium meliloti sulfotransferase that modifies lipopolysaccharides // J. Bacteriol. 2004. V. 186, N13. P. 4168-4176.
50. Elsbach P., Weiss J. The bactericida/permeability-increasing protein (BPI), a potent element in host-defense against gram-negative bacteria and lipopolysaccharide // Immunobiology. 1993. V.187. N.3, P.417-429.
51. Fomsgaard A. Antibodies to lipopolysaccharides: some diagnostic and protective aspects // APMIS Suppl. 1990. - Vol. 18. - P. 1 - 38.

52. Freudenberg M.A., Galanos C. Lipopolysaccharide macrophage interaction: the first step in the development of endotoxin shock // *Exp. Cell. Biol.* 1989. - Vol. 57, № 2. - C. 95 – 100.
53. Huang J.X., Azad M.A.K., Yuriev E., Baker M.A., Nation R.L., Li J., Cooper M.A., Velkov T. Molecular Characterization of Lipopolysaccharide Binding to Human α -1-Acid Glycoprotein. *Journal of Lipids*. 2012, Article ID 475153, doi:10.1155/2012/475153
54. Muller F., Haug C.J., Froland S.S. New immunopathogenetic aspects of infectious diseases // *Tidsskr. Nor. Laegeforen.* 1995. - Vol. 115, N 26. -P. 3259-3262.
55. Novotny A. M., Thomas S., Duron O.S., Relation of structure to function in bacterial O-antigens. 1/ Isolation methods // *J. Bacteriol.* 1963. V. 85, N. 2. P.418-426.
56. Raetz C.R.H., Whitfield C. Lipopolysaccharide endotoxins // *Annu. Rev. Biochem.* 2002. V. 71. P.635-700.
57. Zschiesche W., Semenov B.F., Denner J. Stimulation and suppression of immune responsiveness by viruses // *Immune Modulation by Infectious Agents* / Zschiesche W. (ed.) Jena: VEB Gustav Fischer Verlag. - 1987. -P. 114-201.

ПРИЛОЖЕНИЕ



Башкирский государственный
медицинский университет

СПРАВКА о результатах проверки текстового документа на наличие заимствований

Проверка выполнена в системе
Антиплагиат.ВУЗ

Автор работы	Сафин Рамиль Шамилевич
Факультет, кафедра, номер группы	Б-401Б
Тип работы	Дипломная работа
Название работы	ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ОЦЕНКА ИММУНОМОДУЛИРУЮЩЕЙ АКТИВНОСТИ ЛИПОПОЛИСАХАРИДОВ БАКТЕРИИ PSEUDOMONAS AERUGINOSA1
Название файла	ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ОЦЕНКА ИММУНОМОДУЛИРУЮЩЕЙ АКТИВНОСТИ ЛИПОПОЛИСАХАРИДОВ БАКТЕРИИ PSEUDOMONAS AERUGINOSA1.docx
Процент заимствования	13,00%
Процент цитирования	0,71%
Процент оригинальности	86,29%
Дата проверки	08:47:34 26 июня 2018г.
Модули поиска	Кольцо вузов; Модуль поиска общеупотребительных выражений; Модуль поиска перефразирований Интернет; Модуль поиска Интернет; Модуль поиска переводных заимствований; Цитирование; Коллекция РГБ; Сводная коллекция ЭБС; Модуль выделения библиографических записей; Модуль поиска "БГМУ"
Работу проверил	Кобзева Наталья Рудольфовна ФИО проверяющего
Дата подписи	26.06.2018г.

ФГБОУ ВО БГМУ
Минздрава России
НАУЧНАЯ БИБЛИОТЕКА

Чтобы убедиться
в подлинности справки,
используйте QR-код, который
содержит ссылку на отчет.



Ответ на вопрос, является ли обнаруженное заимствование
корректным, система оставляет на усмотрение проверяющего.
Предоставленная информация не подлежит использованию
в коммерческих целях.

ОТЗЫВ НАУЧНОГО РУКОВОДИТЕЛЯ

Сафин Рамиль Шамилович выполнил выпускную квалификационную работу на тему «ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ОЦЕНКА ИММУНОМОДУЛИРУЮЩЕЙ АКТИВНОСТИ ЛИПОПОЛИСАХАРИДОВ БАКТЕРИИ РОДА *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*».

Представленная работа посвящена проблеме поиска и характеристики иммуномодулирующих свойств липополисахаридов *Pseudomonas aeruginosa* в эксперименте на модели лабораторных животных с индуцированным иммунодефицитом. Для достижения поставленной цели была проведена сравнительная морфометрическая характеристика паренхиматозных органов (печень, почки, селезенка) и сердца лабораторных мышей, оценивался количественный состав форменных элементов крови при введении липополисахаридов *Pseudomonas aeruginosa* на фоне иммунодефицита.

За время обучения в БГМУ Сафин Р.Ш. освоил учебную программу в достаточном объеме.

В процессе выполнения ВКР овладел навыками работы с микроорганизмами и лабораторными животными. Полученные в ходе выполнения результаты были представлены в виде устных сообщений на студенческой конференции.

В ходе выполнения ВКР Сафин Р.Ш. продемонстрировал основные компетенции, которыми должен овладеть обучающийся по окончании учебы по направлению подготовки 06.03.01 – Биология (профиль – микробиология).

Таким образом, выпускная квалификационная работа Сафина Р.Ш. ДОПУСКАЕТСЯ К ЗАЩИТЕ и рекомендуется для положительной оценки.

Научный руководитель:
д.м.н., профессор, зав.кафедрой
фундаментальной и прикладной
микробиологии ФГБОУ ВО БГМУ
Минздрава России



А.Р.Мавзютов

ОТЗЫВ

внешнего рецензента доктора биологических наук Хаматдиновой Земфиры Робертовны на выпускную квалификационную работу Сафина Рамиля Шамилевича «ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ОЦЕНКА ИММУНОМОДУЛИРУЮЩЕЙ АКТИВНОСТИ ЛИПОПОЛИСАХАРИДОВ БАКТЕРИИ РОДА *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*».

Актуальность темы исследования. Одной из наиболее значимых биомедицинских проблем современности является антибиотикорезистентность микроорганизмов. В этой связи актуализируется задача разработки новых способов её решения, в частности, ориентированных на поиск новых иммуномодуляторов.

Известно, что дифференцировка лимфоидной ткани у новорожденных во многом определяется иммуномодулирующими эффектами формирующейся микробиоты кишечника и/или продуктами её жизнедеятельности.

В связи с этим цель данного исследования, направленного на экспериментальную оценку иммуномодулирующих свойств фракций липополисахаридов *Pseudomonas aeruginosa* на модели лабораторных мышей с индуцированным иммунодефицитом, представляется исключительно актуальной.

Достоверность и апробация результатов исследования. В эксперименте были использованы белые беспородные лабораторные мыши 2 фракции *Pseudomonas aeruginosa*, в качестве препарата сравнения был выбран липопид – являющийся синтетическим аналогом бактериальных гликопептидов и относящийся к фармакотерапевтической группе – иммуномодуляторов. Иммунодефицитное состояние создавали путем одноразовой подкожной инъекции циклофосфана в дозе 50 мг/кг за 24 часа перед введением образцов исследуемого биологического материала. Препарат сравнения и исследуемые фракции вводили внутривенно мышам в течение 21 дня. На 22-е сутки проводили забор крови и органов.

Теоретическая и практическая значимость работы. При изучении влияния ЛПС *P. aeruginosa* было обнаружено, что при введении ЛПС-2 мышам на фоне развившегося иммунодефицита наблюдалось снижение весовых характеристик до нормальных значений, в частности сердца наибольшее повышение количества базофилов на 125%, эозинофилов на 105,9%, сегментоядерных на 88,75% и лимфоцитов 21,3%.

Таким образом, показанная на иммунодефицитных мышах иммуностимулирующая активность некоторых фракций ЛПС *P. aeruginosa* открывает возможность продолжения данных исследований, поскольку предполагает терапевтические перспективы ее применения для человека.

Оценка содержания, завершенности и оформления ВКР. Работа изложена в традиционной форме. Включает введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты и обсуждение, выводы и список использованной литературы. Оформление соответствует требованиям ГОСТ Р 7.0.11-2011.

Заключение. Таким образом, выпускная квалификационная работа Сафина Рамиля Шамилевича, выполненная под руководством доктора медицинских наук, профессора Мавзютова А.Р., является завершенной и соответствует требованиям ФГОС ВО (приказ Минобрнауки РФ №944 от 07.08.2014 г.) по направлению подготовки 06.03.01. – Биология (бакалавриат).

Доктор биологических наук и/о заведующей иммунологической лабораторией с отделением клинической иммунологии ГБУЗ «Республиканской детской клинической больницы (Адрес: г. Уфа, ул. Мухоморова, 98. Тел.: (347)2 290839; Факс: ; E-mail: imunlab@mail.ru)



Хаматдинова Земфира Робертовна

ОТЗЫВ НАУЧНОГО РУКОВОДИТЕЛЯ

Сафин Рамиль Шамилевич выполнил выпускную квалификационную работу на тему «ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ОЦЕНКА ИММУНОМОДУЛИРУЮЩЕЙ АКТИВНОСТИ ЛИПОПОЛИСАХАРИДОВ БАКТЕРИИ РОДА *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*».

Представленная работа посвящена проблеме поиска и характеристики иммуномодулирующих свойств липополисахаридов *Pseudomonas aeruginosa* в эксперименте на модели лабораторных животных с индуцированным иммунодефицитом. Для достижения поставленной цели была проведена сравнительная морфометрическая характеристика паренхиматозных органов (печень, почки, селезенка) и сердца лабораторных мышей, оценивался количественный состав форменных элементов крови при введении липополисахаридов *Pseudomonas aeruginosa* на фоне иммунодефицита.

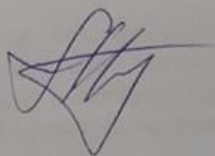
За время обучения в БГМУ Сафин Р.Ш. освоил учебную программу в достаточном объеме.

В процессе выполнения ВКР овладел навыками работы с микроорганизмами и лабораторными животными. Полученные в ходе выполнения результаты были представлены в виде устных сообщений на студенческой конференции.

В ходе выполнения ВКР Сафин Р.Ш. продемонстрировал основные компетенции, которыми должен овладеть обучающийся по окончании учебы по направлению подготовки 06.03.01 – Биология (профиль – микробиология).

Таким образом, выпускная квалификационная работа Сафина Р.Ш. ДОПУСКАЕТСЯ К ЗАЩИТЕ и рекомендуется для положительной оценки.

Научный руководитель:
д.м.н., профессор, зав.кафедрой
фундаментальной и прикладной
микробиологии ФГБОУ ВО БГМУ
Минздрава России



А.Р.Мавзютов