

ОПСОНИЗИРУЮЩИЕ СВОЙСТВА КОММЕРЧЕСКОГО АНТИСТАФИЛОКОККОВОГО ИММУНОГЛОБУЛИНА

Слободчикова С.В.¹, Шмагель К.В.^{1, 2}

¹ Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН, г. Пермь

² Пермская государственная медицинская академия им. акад. Е.А. Вагнера, г. Пермь

Резюме. Антистафилококковый иммуноглобулин широко применяется для лечения заболеваний стафилококковой этиологии. Однако, в русскоязычной литературе отсутствуют сведения, обосновывающие эффективность данного препарата с позиций доказательной медицины. Учитывая решающую роль фагоцитоза в защите макроорганизма от патогенных стафилококков и значение опсонизации для фагоцитарных реакций, проведено исследование опсонизирующей активности антистафилококкового иммуноглобулина по отношению к *S. aureus* Wood 46 и *S. aureus* Cowan I. В качестве препарата сравнения использован иммуноглобулин человеческий нормальный. Оба препарата в одинаковой степени влияют на кислородзависимую бактерицидность фагоцитов. Нормальный иммуноглобулин активнее, чем антистафилококковый, усиливает поглотительную активность нейтрофилов и образование агрегатов бактерий. Анализ результатов исследования, а также сообщений в отечественных и зарубежных источниках литературы, ставят под сомнение целесообразность использования антистафилококкового иммуноглобулина в лечении инфекций стафилококковой этиологии.

Ключевые слова: антистафилококковый иммуноглобулин, нормальный иммуноглобулин, *S. aureus*, опсонизация, фагоцитоз.

Slobodchikova S.V., Schmagel K.V.

OPSONIZING PROPERTIES OF A COMMERCIAL ANTISTAPHYLOCOCCAL IMMUNOGLOBULIN

Abstract. Antistaphylococcal immunoglobulins (ASiG) are widely used for treatment of staphylococcal infections. However, Russian literature sources still lack any evidence-based data justifying clinical efficiency of this preparation. Taking into account a key role of phagocytosis for a macro-organism resistance to staphylococci, and importance of microbial opsonization in this response, a trial of antistaphylococcal immunoglobulin-mediated opsonizing activity was performed with *S. aureus* Wood 46 and *S. aureus* Cowan I strains. A normal human Ig preparation was used as a reference substance. Both preparations influenced oxygen-dependent bactericidal effects of phagocytes to a similar degree. Normal immunoglobulin proved to be more active than ASiG, with respect to neutrophil ingestion properties and bacterial aggregation. Hence, present results, along with relevant data from Russian and foreign literature put in question the ASiG expediency for medication of staphylococcal infections. (*Med. Immunol.*, 2012, vol. 14, N 1-2, pp 95-102)

Keywords: antistaphylococcal immunoglobulin, normal immunoglobulin, *S. aureus*, opsonization, phagocytosis.

Введение

Внимание исследователей к стафилококковой инфекции связано с широким распространением

данной патологии [9], многообразием клинических форм [14], появлением антибиотикоустойчивых штаммов [9] и отсутствием эффективной вакцины [18]. Для лечения стафилококковых инфекций дополнительно к антибиотикам ведется разработка новых лекарственных препаратов [18]. В качестве одного из средств комплексного лечения стафилококковых инфекций в России применяется препарат антистафилококкового иммуноглобулина (АСИ). Данное лекарственное средство представляет собой фракцию имму-

Адрес для переписки:

Слободчикова Светлана Вадимовна,

ИЭГМ УрО РАН

614081, г. Пермь, ул. Голева, 13.

Тел.: (342) 280-74-42, 280-83-34.

Факс: (342) 280-92-11.

E-mail: ecolimmlab@yandex.ru

ноглобулинов класса G, получаемых из плазмы крови доноров, иммунизированных стафилококковым анатоксином – комплексным препаратом, содержащим несколько инактивированных токсинов стафилококка. Считается, что наиболее важную роль в патогенезе стафилококковых инфекций играет α -токсин стафилококка [1]. Эффективность специфического иммуноглобулина связывают с содержанием в нем большого количества анти-альфа-стафилолизина – антител, нейтрализующих α -токсин. Препараты, аналогичные антистафилококковому иммуноглобулину, на зарубежном фармацевтическом рынке отсутствуют [15].

К настоящему времени установлено, что основным механизмом защиты макроорганизма от стафилококка является фагоцитоз. Так, уменьшение числа нейтрофилов или их функциональные дефекты повышают восприимчивость макроорганизма к стафилококковой инфекции и существенно отягощают ее течение [17, 19, 22]. Генетические дефекты нейтрофилов, сопровождающиеся угнетением хемотаксиса, ослаблением внутриклеточной бактерицидности, нарушением формирования фаголизосом, также приводят к повышенной восприимчивости макроорганизма к стафилококку [17, 22].

Важнейшими стимуляторами фагоцитоза являются опсоины (антитела, комплемент, белки острой фазы). Антитела класса G способны непосредственно усиливать фагоцитоз без участия комплемента, взаимодействуя с Fc-рецепторами лейкоцитов [12]. Дефицит иммуноглобулинов отрицательно сказывается на течении стафилококковой инфекции [7]. В то же время антитела к антигенам стафилококка, присутствующие в крови здоровых людей, не всегда защищают организм от развития инфекции [10].

Широкое использование специфического иммуноглобулина в лечении стафилококковых инфекций и отсутствие сведений об очевидной терапевтической эффективности препарата [1, 15] обуславливают необходимость по-новому оценить свойства антистафилококкового иммуноглобулина. **Целью настоящей работы** было исследование влияния АСИ на фагоцитарные реакции.

Материалы и методы

Подготовка объектов фагоцитоза (ОФ). Для исследования свойств иммуноглобулинов были взяты штаммы стафилококка, отличающиеся по экспрессии белка А, обладающего свойством неспецифически связывать иммуноглобулины: *S. aureus Cowan I* (белок А⁺) и *S. aureus Wood 46* (белок А⁻). Обезвреженные формалином стафилококки хранили в виде суспензии в 20% растворе глицерина на физиологическом раство-

ре при минус 20 °С. Концентрацию стафилококка определяли фотометрически при 600 нм относительно стандартов мутности. Окраску стафилококков осуществляли флюоресцеина изотиоцианатом (ФИТЦ; Sigma, США) по общепринятой методике [5].

Опсонизацию бактерий (10¹⁰ кл/мл) проводили путем их инкубирования в растворе АСИ в течение 40 мин при 37 °С. Концентрация специфического иммуноглобулина составляла 25 мг/мл по белку, что соответствовало среднему уровню антиальфа-стафилолизина (8,25 МЕ/мл) в сыворотке крови доноров, иммунизированных стафилококковым анатоксином. В качестве препарата сравнения использовали раствор нормального иммуноглобулина (НИ) в концентрации 25 мг/мл по белку. Затем бактерии трехкратно отмывали 0,15М NaCl и определяли концентрацию стафилококка как указано выше.

Исследование иммуноглобулинсвязывающей активности штаммов стафилококка. На предварительном этапе был проведен контроль иммуноглобулинсвязывающей активности штаммов, взятых для исследований. Для этого *S. aureus Cowan I* и *S. aureus Wood 46* в возрастающих количествах инкубировали в растворе НИ с постоянной, предварительно подобранной и удобной для спектрофотометрического контроля концентрацией (0,3 мг/мл). Затем пробы центрифугировали (1500 g, 20 мин) и определяли оптическую плотность (ОП) супернатантов при 280 нм.

Спектротурбидиметрическое определение средних размеров неопсонизированных и опсонизированных микробных клеток. Метод спектротурбидиметрии основан на спектральной зависимости интенсивности луча света, прошедшего через дисперсную среду, от размера частиц суспензии [3]. Разведения компонентов готовили в физиологическом растворе. Взвесь *S. aureus Cowan I* или *S. aureus Wood 46* в концентрации 2 × 10⁹ кл/мл и раствор АСИ или НИ 1 мг/мл смешивали в равных объемах и инкубировали в течение 40 мин при 37 °С. После инкубации пробы разводили физиологическим раствором в 2 раза и регистрировали ОП суспензий при 470 нм, 510 нм, 550 нм, 590 нм и 630 нм на спектрофотометре Shimadzu UV mini-1240. Из значений ОП суспензий вычитали ОП раствора соответствующего иммуноглобулина. Волновые экспоненты рассчитывали по уравнению:

$$n = \frac{\Delta \lg ОП}{\Delta \lg \lambda},$$

где n – волновой экспонент, λ – длина волны. Расчеты диаметра частиц суспензии на основе волновых экспонентов проводили по алгоритму, представленному в работе Королевской Л.Б. [4].

Исследование поглотительной активности лейкоцитов. При исследовании фагоцитарных реакций использовались две концентрации стафилококков – 10^6 кл/мл и 10^8 кл/мл. Компоненты реакций готовили на растворе Хенкса без фенолового красного (Sigma, США).

Лейкоциты из гепаринизированной (25 ЕД/мл) венозной крови условно здоровых добровольцев (20 человек: 13 мужчин и 7 женщин) в возрасте от 20 до 55 лет выделяли путем обогащения в растворе декстрана сульфата 500 Т (Loba Feinchemic). Количество нейтрофилов в лейкоцитах соответствовало 10^5 кл/мл. Оценку поглощения ФИТЦ-меченных стафилококков [5] проводили на проточном цитофлуориметре BD FACSCalibur (Becton Dickinson, США). По полученным результатам рассчитывали следующие показатели:

1) фагоцитарное число (ФЧ) – отношение средней интенсивности флуоресценции одного поглотившего стафилококки нейтрофила к средней интенсивности флуоресценции ФИТЦ-меченой бактериальной клетки;

2) фагоцитарный индекс (ФИ) – процент клеток, поглотивших ОФ;

3) интегральный показатель поглощения (ИПП): число ОФ, поглощенных 100 нейтрофилами (ИПП = ФЧ \times ФИ).

Исследование люминолзависимой хемилюминесценции лейкоцитов (ЛЗХЛ). Лейкоциты получали методом естественного оседания форменных элементов крови. Подготовку проб и регистрацию люминесценции проводили, как указано ранее [6]. Соотношение нейтрофилов и бактерий в реакционной смеси соответствовало таковому в экспериментах по исследованию поглотительной активности лейкоцитов. Результаты выражали в интегральных значениях относительных световых единиц (relative luminescence light units, RLU).

Статистическая обработка результатов. Достоверность различий определяли на основе парного t-критерия Стьюдента. Сравнение показателей, полученных при исследовании поглощения бактерий фагоцитами (ИПП) и в реакции ЛЗХЛ, проводили на основе логарифмированных величин (распределение величин в выборках не соответствовало нормальному). Результаты выражали в виде средних геометрических. Влияние факторов оценивали однофакторным дисперсионным анализом.

Результаты

Исследование поглощения неопсонизированных стафилококков. Интенсивность поглощения неопсонизированных стафилококков нейтрофилами периферической крови зависела от штамма и количества микроорганизмов,

внесенных в систему. При большой концентрации бактерий (10^8 кл/мл) значение ИПП нейтрофилов для штамма *Wood 46* составило 41,2 ($\ln = 3,718 \pm 0,199$; рис. 1), а для штамма *Cowan I* – 166,2 ($\ln = 5,113 \pm 0,123$; $P < 0,001$). Различия в интенсивности поглощения *S. aureus Wood 46* и *Cowan I* при невысоком их содержании в реакционной смеси (10^6 кл/мл) отсутствовали: ИПП фагоцитов 4,5 ($\ln = 1,505 \pm 0,202$) и 6,3 ($\ln = 1,846 \pm 0,121$), соответственно ($P > 0,05$). Таким образом, при избыточном количестве в реакционной смеси неопсонизированных бактерий (1000 на 1 полиморфноядерный лейкоцит) процесс интернализации нейтрофилами *S. aureus Cowan I* осуществлялся в 4 раза активнее по сравнению с поглощением *S. aureus Wood 46*.

Связывание иммуноглобулина штаммами стафилококка в зависимости от содержания белка А. Инкубация штамма *S. aureus Wood 46* с человеческим иммуноглобулином не оказывала существенного влияния на показатели ОП супернатантов (рис. 2): при всех использованных концентрациях бактерий содержание белка в растворе статистически достоверно не изменялось ($P_F > 0,05$). Иная картина наблюдалась при инкубации *S. aureus Cowan I*. Увеличение содержания микроорганизмов в суспензии приводило к снижению ОП надосадочного раствора ($P_F < 0,002$). Полученные результаты свидетельствуют о том, что *S. aureus Cowan I*, в отличие от штамма *Wood 46*, неспецифически связывает НИ за счет присутствия белка А на поверхности бактериальной клетки.

Влияние АСИ на поглощение S. aureus Wood 46. После опсонизации *S. aureus Wood 46* специфическим иммуноглобулином были получены следующие показатели интернализации микробов фагоцитами (рис. 3А). При низкой концентрации (10^6 кл/мл) бактерий ИПП нейтрофилов составил 214,3 ($\ln = 5,367 \pm 0,118$), а в условиях высокого их содержания (10^8 кл/мл) – 2149,0 ($\ln = 7,673 \pm 0,087$). Сравнение этих данных с аналогичными результатами, полученными без опсонизации, продемонстрировало увеличение поглотительной активности нейтрофилов под влиянием АСИ, соответственно в 47,8 и 52,2 раза. Различия в обоих случаях были высоко достоверны ($P \ll 0,001$). Вместе с тем, в контрольном исследовании, в котором для опсонизации бактерий использовали НИ, значение ИПП нейтрофилов в смеси, содержащей 10^6 микробов в мл, составило 350,3 ($\ln = 5,859 \pm 0,317$), а при 100-кратно большей концентрации стафилококков – 2883,8 ($\ln = 7,967 \pm 0,054$). В первом случае под влиянием опсонина поглощение стафилококков увеличилось в 78,0 раз ($P \ll 0,001$), во втором – в 70,0 раз ($P \ll 0,001$).

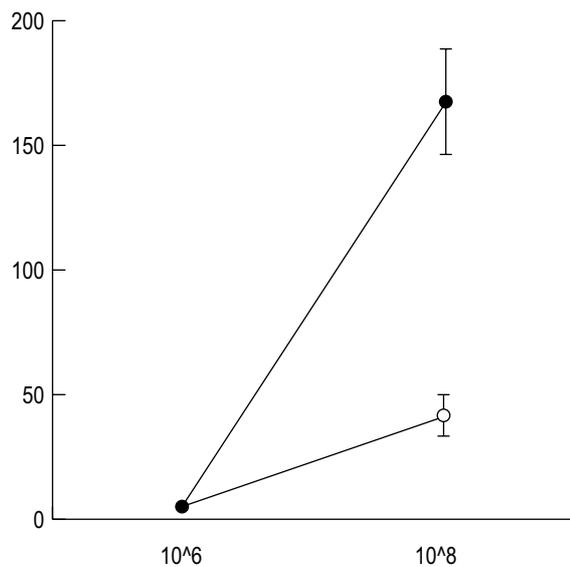


Рисунок 1. Поглощение неопсонизированного *S. aureus Wood 46* (○) и *S. aureus Cowan I* (●) нейтрофилами периферической крови

Примечание. По оси абсцисс: концентрации микроорганизмов в реакционной смеси, кл/мл; по оси ординат: интегральный показатель поглощения (ИПП) нейтрофилов. Представлены средние геометрические и их ошибки.

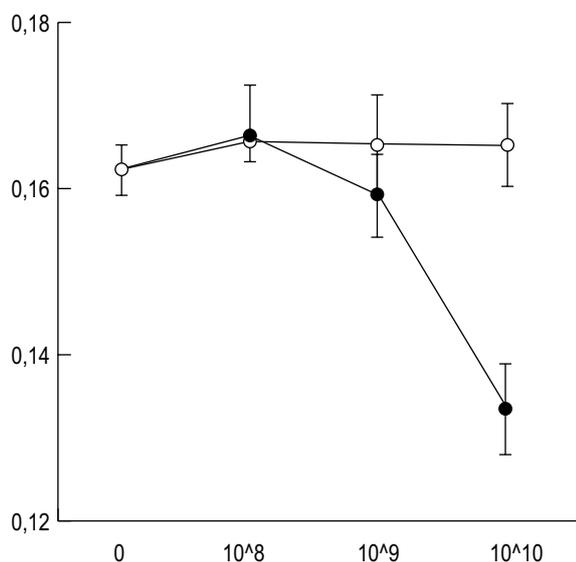


Рисунок 2. Содержание белка в супернатанте после инкубации стафилококков в растворе НИ ($M \pm m$)

Примечание. По оси абсцисс: концентрация стафилококков при инкубации в растворе НИ, кл/мл; по оси ординат: оптическая плотность супернатанта при 280 нм. Условные обозначения: ○ – *S. aureus Wood 46*, ● – *S. aureus Cowan I*.

Из полученных результатов следует, что в отношении стафилококка, не содержащего белок А, нормальный иммуноглобулин обладает более выраженными опсонизирующими свойствами по сравнению с препаратом специфического иммуноглобулина ($P < 0,05$ при концентрации ОФ 10^8 кл/мл).

Влияние АСИ на поглощение *S. aureus Cowan I*. Опсонизация специфическим иммуноглобулином усиливала поглощение стафилококка штамма *Cowan I* (рис. 3Б). В присутствии низкой концентрации бактерий (10^6 кл/мл) ИПП нейтрофилов составил 19,9 ($\ln = 2,992 \pm 0,107$; увеличение в 3,2 раза по сравнению с ИПП неопсонизированного объекта; $P < 0,001$), а при высоком содержании микробов (10^8 кл/мл) – 621,8 ($\ln = 6,433 \pm 0,170$; увеличение в 3,7 раза относительно соответствующего показателя, полученного без опсонизации; $P < 0,01$). В контрольном исследовании с НИ установлены следующие значения ИПП: 33,4 ($\ln = 3,508 \pm 0,132$; усиление опсонизацией в 5,3 раза; $P < 0,001$) – при малой концентрации бактерий и 1114,0 ($\ln = 7,016 \pm 0,082$; обусловленное опсонинами увеличение в 6,7 раза; $P < 0,001$) – при большой. Показатели контрольного исследования с НИ достоверно превышали соответствующие значения, полученные при опсонизации *Cowan I* АСИ ($P < 0,002$ и $P < 0,03$, соответственно). Следовательно, антистафилококковый иммуноглобулин уступает нормальному иммуноглобулину в способности усиливать поглощение стафилококка независимо от содержания белка А на его поверхности.

Анализ данных позволяет обнаружить также влияние штамма микроорганизмов на способность иммуноглобулинов усиливать фагоцитоз. Так, при невысоком содержании микробов *Wood 46* и *Cowan I*, опсонизированных специфическим иммуноглобулином, соответствующие значения ИПП нейтрофилов составили 214,3 ($\ln = 5,367 \pm 0,118$) и 19,9 ($\ln = 2,992 \pm 0,107$): различие в эффективности поглощения разных штаммов стафилококка превысило 10 раз ($P \ll 0,001$). При 100-кратно большей концентрации бактерий соответствующие значения ИПП были 2149,0 ($\ln = 7,673 \pm 0,087$) и 621,8 ($\ln = 6,433 \pm 0,170$): различие в 3,5 раза ($P \ll 0,001$). При опсонизации штаммов *Wood 46* и *Cowan I* НИ были получены следующие пары значений ИПП, соответственно: концентрация микробов 10^6 кл/мл – 350,3 ($\ln = 5,859 \pm 0,317$) и 33,4 ($\ln = 3,508 \pm 0,132$; $P \ll 0,001$), 10^8 кл/мл – 2883,8 ($\ln = 7,967 \pm 0,054$) и 1114,0 ($\ln = 7,016 \pm 0,082$; $P \ll 0,001$). Следовательно, независимо от специфичности, коммерческие иммуноглобулины больше усиливают поглощение нейтрофилами белок А негативно-

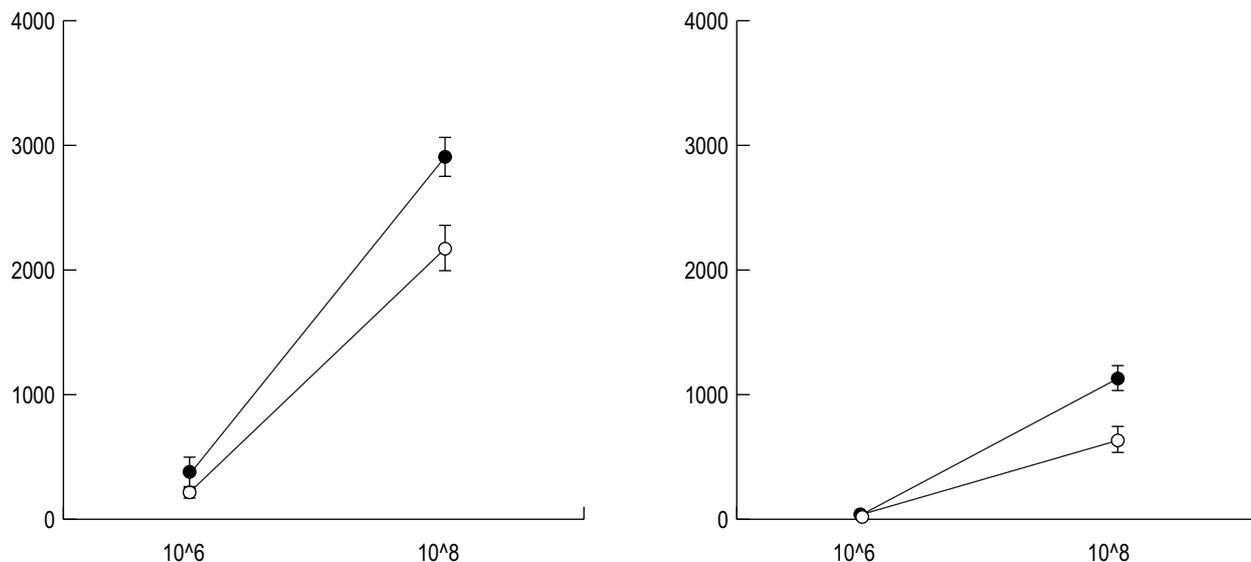


Рисунок 3. Влияние опсонизации *S. aureus Wood 46* (А) и *S. aureus Cowan I* (Б) антистафилококковым (○) и нормальным (●) иммуноглобулинами на ИПП нейтрофилов

Примечание. По оси абсцисс: концентрация стафилококков в реакционной смеси, кл/мл; по оси ординат: ИПП нейтрофилов. Представлены средние геометрические и их ошибки.

го (*S. aureus Wood 46*), чем белок А позитивного (*S. aureus Cowan I*) штамма стафилококков. При этом из двух препаратов — АСИ и НИ — первый по опсонической активности уступает второму.

Спектротурбидиметрическое определение изменения средних размеров частиц стафилококковых суспензий под влиянием иммуноглобулинов. По данным спектротурбидиметрических измерений, средний диаметр клеток неопсонизированных *S. aureus Wood 46* и *Cowan I* составил $694,1 \pm 5,8$ нм и $608,5 \pm 4,3$ нм, соответственно. Полученные значения согласуются с установленными размерами бактерий рода стафилококк.

Добавление раствора АСИ к взвеси *S. aureus Wood 46* (рис. 4) приводило к увеличению среднего диаметра стафилококков с $694,1 \pm 5,8$ нм до $925,1 \pm 8,3$ нм ($P < 0,001$). В параллельном исследовании с раствором НИ средний размер частиц во взвеси оказался равен $946,6 \pm 6,2$ нм: увеличение диаметра на 252,5 нм по сравнению с размером неопсонизированных бактерий ($P < 0,001$). Разница средних диаметров *S. aureus Wood 46*, обработанных АСИ и НИ, составила 21,5 нм ($P < 0,02$).

При инкубации штамма *Cowan I* в растворе НИ средний размер частиц взвеси увеличился с $608,5 \pm 4,3$ нм до $698,5 \pm 1,9$ нм ($P < 0,001$). Но эта величина была существенно меньше средних размеров частиц опсонизированного штамма *Wood 46* ($P < 0,001$). Таким образом, препараты иммуноглобулинов увеличивают средний размер частиц стафилококковой суспензии, однако влияние НИ по сравнению с АСИ было выражено сильнее. Белок А содержащий штамм *Cowan I*

хуже опсонизируется иммуноглобулинами по сравнению со штаммом *Wood 46*.

Исследование влияния АСИ на кислородзависимую бактерицидность лейкоцитов. Уровень хемилюминесценции лейкоцитов, стимулированных неопсонизированными стафилококками *Cowan I* и *Wood 46* в концентрации 10^8 кл/мл, составил, соответственно, 79,3 ($\ln = 4,373 \pm 0,369$) и 117,1 ($\ln = 4,763 \pm 0,215$) RLU (рис. 5). Различия между группами недостоверны ($P > 0,05$). АСИ усиливал реакцию фагоцитов: уровень ЛЗХЛ повышался при добавлении опсонизированного штамма *Cowan I* до 133,2 ($\ln = 4,892 \pm 0,250$) RLU ($P < 0,02$), а при внесении в реакцию обработанного специфическим иммуноглобулином штамма *Wood 46* — до 176,3 ($\ln = 5,172 \pm 0,292$) RLU ($P < 0,01$). НИ также вызывал повышение ответа лейкоцитов: величина люминесценции составила для *S. aureus Cowan I* 139,4 ($\ln = 4,938 \pm 0,249$) RLU ($P < 0,01$), а для *S. aureus Wood 46* — 176,7 ($\ln = 5,175 \pm 0,306$) RLU ($P < 0,01$). Активность ЛЗХЛ, индуцированной опсонизированными стафилококками, не зависела от использованного для опсонизации типа иммуноглобулина ($P > 0,05$). Вместе с тем, опсонизированный *S. aureus Wood 46* по сравнению с опсонизированным *S. aureus Cowan I* являлся более сильным активатором ЛЗХЛ. Он вызывал достоверно более высокий уровень образования свободных радикалов как после взаимодействия с АСИ ($P < 0,01$), так и после связывания с НИ ($P < 0,03$).

Влияние бактерий в концентрации 10^6 кл/мл (и неопсонизированных, и опсонизированных) было очень слабым. Достоверных различий меж-

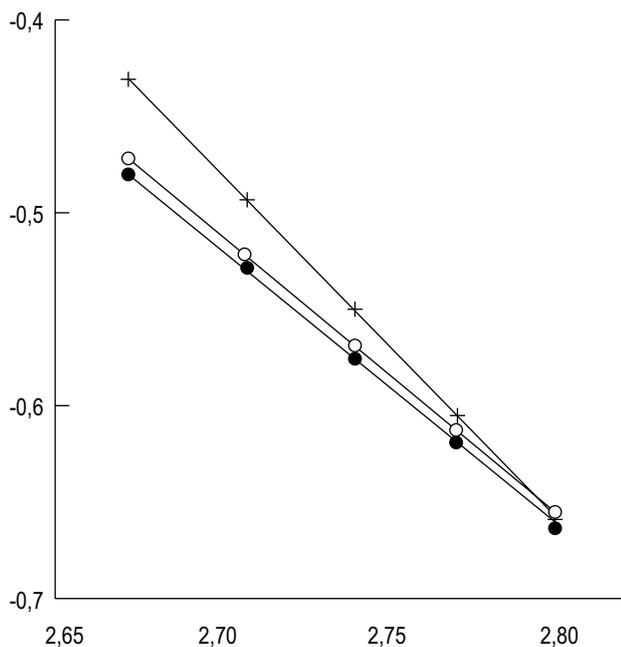


Рисунок 4. Спектротурбидиметрические показатели суспензий неопсонизированного и опсонизированного АСИ и НИ *S. aureus* Wood 46

Примечание. По оси абсцисс: \lg длины волны; по оси ординат: \lg оптической плотности. Условные обозначения: + – неопсонизированный стафилококк, o – взвесь бактерий, инкубированных в растворе АСИ, • – то же, но в растворе НИ. Прямые, соединяющие точки, линии тренда. Угол наклона графика соответствует среднему размеру частиц суспензии.

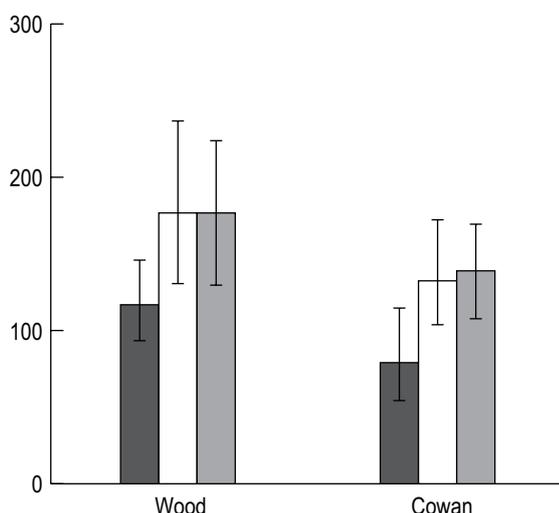


Рисунок 5. Люминолзависимая хемилюминесценция лейкоцитов, стимулированных 10^8 кл/мл *S. aureus* Wood 46 и *S. aureus* Cowan I

Примечание. По оси ординат: интегральные значения относительных световых единиц (relative luminescence light units (RLU)). Условные обозначения: черные столбцы – неопсонизированный стафилококк, белые столбцы – опсонизация бактерий АСИ, серые столбцы – опсонизация бактерий НИ. Представлены средние геометрические и их ошибки.

ду группами выявлено не было (данные не приводятся).

Обсуждение

Проведенное исследование показало, что, не смотря на наличие специфических антител, опсонизирующие свойства АСИ уступают таковым препарата НИ. АСИ вызывает меньшую агрегацию бактерий и в меньшей степени увеличивает поглощение стафилококков фагоцитами. АСИ не отличаются от НИ по способности усиливать кислородзависимую бактерицидность лейкоцитов.

Спектротурбидиметрические параметры опсонизированных и неопсонизированных бактерий дают представление лишь о среднем размере частиц суспензии [3]. Рост последнего при опсонизации может быть обусловлен, на наш взгляд, двумя процессами: образованием оболочки опсопинов вокруг бактерий и агрегацией микробов за счет перекрестного «сшивания» специфическими антителами. Если в качестве ведущего фактора рассматривать первый вариант, то, исходя из среднего размера молекулы IgG (10 нм) [20], толщина гипотетического слоя иммуноглобулинов должна превышать величину молекулы IgG более чем в 10 раз, что маловероятно. Повидимому, ключевую роль в изменении среднего размера микробных частиц играет образование агрегатов бактерий под влиянием антител. Исходя из того, что средний диаметр частиц *S. aureus* Wood 46 в присутствии НИ оказался достоверно больше, чем в присутствии АСИ, можно предположить, что НИ содержит большее по сравнению с АСИ количество антистафилококковых антител.

Образование агрегатов бактерий может оказать влияние на интенсивность поглощения, поскольку известно, что скорость реакций фагоцитоза зависит от размера поглощаемых частиц [8, 13]. Например, по данным Champion J.A. et al. наиболее интенсивное нарастание скорости фагоцитоза происходит при увеличении диаметра частиц от 0,93 до 2-3 мкм. Возможно, поэтому данные спектротурбидиметрии соответствовали показателям поглощения опсонизированных объектов нейтрофилами: чем больше был средний размер частиц в суспензии, тем активнее их захватывали фагоциты. Средний диаметр частиц *S. aureus* Wood 46 в присутствии НИ оказался больше, чем в окружении АСИ. Их интернализация также протекала более активно. Средний размер частиц суспензии *S. aureus* Cowan I в НИ был меньше, чем средний размер частиц взвеси *S. aureus* Wood 46 в любом из иммуноглобулинов. И уровень поглощения фагоцитами опсонизированного штамма Cowan I был существенно

ниже по сравнению с соответствующими показателями, установленными для штамма *Wood 46*. Большая степень агрегации бактерий под влиянием нормального иммуноглобулина отражается на интенсивности поглощения опсонизированных стафилококков.

Следующим этапом изучения опсонизирующих свойств антистафилококкового иммуноглобулина было определение его влияния на кислородзависимую бактерицидность фагоцитов. Очевидно, что степень влияния антител на ЛЗХЛ не столь велика, как на реакцию поглощения. Антистафилококковый и нормальный иммуноглобулины внесли равный вклад в усиление ЛЗХЛ. Однако на реализацию свойств иммуноглобулинов оказал влияние штамм микроорганизмов. Опсонизированный *S. aureus Wood 46* оказался более сильным активатором ЛЗХЛ. С одной стороны это может быть связано с большим размером опсонизированных бактерий, а, следовательно, и количеством доступных для фагоцитарных Fc-рецепторов соответствующих фрагментов иммуноглобулинов. С другой стороны, на уровень ЛЗХЛ влияет характер взаимодействия антител с бактериальной клеткой. Обычно уровень ЛЗХЛ коррелирует с количеством IgG, специфически связанным с поверхностными структурами микроорганизма [24]. При этом известно, что молекулы иммуноглобулина, взаимодействующие с белком А (*S. aureus Cowan I*) через Fc-фрагмент, на хемилюминесцентный ответ лейкоцитов не влияют [24]. Следовательно, неспецифически связывая антистафилококковые антитела, белок А может вносить свой вклад в снижение уровня кислородзависимой бактерицидности фагоцитов, препятствуя развитию полноценной фагоцитарной реакции.

Объяснение существования некоторых различий в опсонизирующих свойствах двух иммуноглобулинов можно найти в способе производства этих препаратов. НИ получают из образцов сыворотки крови не менее тысячи здоровых доноров (инструкция к препарату). Учитывая, что около 20% людей относятся к группе так называемых «не носителей» стафилококка [16] и отличаются продукцией к нему защитных антител [10], большое число образцов сывороток, используемых для производства препарата, обеспечивает наличие опсонизирующих антител к «ключевым» для защиты антигенам. В то же время, решающим фактором для отбора сывороток при производстве антистафилококкового иммуноглобулина является титр антистафилолизина. Доноров подвергают иммунизации стафилококковым анатоксином. Это, в свою очередь, может снижать количество антител других специфичностей [21, 23].

Учитывая ряд фактов, что НИ по сравнению с АСИ, способствует более активному агрегированию стафилококков, вызывает более эффективное их поглощение и в равной мере с АСИ влияет на ЛЗХЛ, а также отсутствие исследований, определяющих эффективность АСИ с позиций доказательной медицины [15], можно предложить использование НИ вместо АСИ в лечении стафилококковых заболеваний. Отдельным аргументом в пользу применения НИ может служить высокая стоимость специфического препарата. Следует указать, что идея использования НИ при стафилококковых заболеваниях высказывалась ранее [2].

С другой стороны, эффективность применения НИ в лечении заболеваний стафилококковой этиологии активно дискутируется до сих пор. Прежде всего, это связано с отсутствием четкого и полного представления о механизмах его действия [11]. Поэтому вопрос об альтернативном лечении стафилококковых заболеваний остается открытым и требует дальнейшего изучения.

Работа поддержана программой Президиума РАН «Фундаментальные науки – медицине». № проекта: 09-П-4-1015.

Список литературы

1. Выгодчиков Г.В. Стафилококковые инфекции (микробиология, иммунология и эпидемиология). – М.: Медгиз, 1963. – 272 с.
2. Карницкая Н.В., Левина М.Н., Лукатос Е.А. Нормальный γ -глобулин человека как носитель специфических антистафилококковых антител // Препараты нормальных и специфических иммуноглобулинов человека. Сборник научных трудов Московского НИИ эпидемиологии и микробиологии. – 1975. – Т. XVIII. – С. 102-106.
3. Кленин В.И., Щеголев С.Ю., Лаврушин В.И. Характеристические функции светорассеяния дисперсных систем. – Изд-во Саратовского университета. – 1977. – 177 с.
4. Королевская Л.Б., Шмагель К.В. Спектротурбидиметрическое определение размера иммунных агрегатов сывороток крови, образованных в полиэтиленгликоле // Иммунология. – 2010. – № 2. – С. 108-111.
5. Пинегин Б.В., Ярилин А.А., Симонова А.В., Климова С.В., Мазуров Д.В., Дамбаева С.В., Бахус Г.О. Оценка поглотительной активности фагоцитов периферической крови человека // Применение проточной цитометрии для оценки функциональной активности иммунной системы человека. Пособие для врачей лаборантов. – М., 2001. – С. 31-35.
6. Слободчикова С.В., Шмагель К.В., Раев М.Б., Бахметьев Б.А. Влияние человече-

ского трофобластического β 1-гликопротеина на стимулированную люминолзависимую хемилюминесценцию лейкоцитов // Российский иммунологический журнал. – 2009. – № 3 (12). – С. 338-342.

7. Aydogan M., Eifan A.O., Gocmen I., Ozdemir C., Bahceciler N.N., Barlan I.B. Clinical and Immunologic Features of Pediatric Patients With Common Variable Immunodeficiency and Respiratory Complications // J. Investig. Allergol. Clin. Immunol. – 2008. – Vol. 18, N 4. – P. 260-265.

8. Champion J.A., Walker A., Mitragotri S. Role of Particle Size in Phagocytosis of Polymeric Microspheres // Pharm. Res. – 2008. – Vol. 25, N 8. – P. 1815-1821.

9. DeLeo F.R., Diep B.A., Otto M. Host defense and pathogenesis in Staphylococcus aureus infections // Infect. Dis. Clin. North. Am. – 2009. – Vol. 23, N 1. – P. 17-34.

10. Dryla A., Prustomersky S., Gelbmann D., Hanner M., Bettinger E., Kocsis B., Kustos T., Henics T., Meinke A., Nagy E. Comparison of Antibody Repertoires against Staphylococcus aureus in Healthy Individuals and in Acutely Infected Patients // Clin. Diagn. Lab. Immunol. – 2005. – Vol. 12, N 3. – P. 387-398.

11. Durandy A., Kaveri S.V., Kuijpers T.W., Basta M., Miescher S., Ravetch J.V., Rieben R. Intravenous immunoglobulins – understanding properties and mechanisms // Clinical and Experimental Immunology. – 2009. – Vol. 158. – P. 2-13.

12. Garcia-Garcia E., Rosales C. Signal transduction during Fc receptor-mediated phagocytosis // J. Leukoc. Biol. – 2002. – Vol. 72. – P. 1092-1108.

13. Ishikawa Y., Muramatsu N., Ohshima H., Kondo T. Effect of particle size on phagocytosis of latex particles by guinea-pig polymorphonuclear leucocytes // J. Biomater. Sci. Polym. Ed. – 1991. – N 2 (1). – P. 53-60.

14. Iwatsuki K., Yamasaki O., Morizane S., Oono T. Staphylococcal cutaneous infections: Invasion, evasion and aggression // Journal of Dermatological Science. – 2006. – Vol. 42. – P. 203-214.

15. Kelly J. Immunotherapy against antibiotic-resistant bacteria: the Russian experience with

an antistaphylococcal hyperimmune plasma and immunoglobulin // Microbes and Infection. – 2000. – N 2. – P. 1383-1392.

16. Kluytmans J., Belkum van A., Verbrugh H. Nasal carriage of Staphylococcus aureus: epidemiology, underlying mechanisms, and associated risks // Clin. Microbiol. Rev. – 1997. – Vol. 10, N 3. – P. 505-520.

17. Lekstrom-Himes J.A., Gallin J.I. Immunodeficiency diseases caused by defects in phagocytes // The New England Journal of Medicine. – 2000. – Vol. 343, N 23. – P. 1703-1714.

18. Middleton J.R. Staphylococcus aureus antigens and challenges in vaccine development // Expert Rev. Vaccines. – 2008. – Vol. 7, N 6. – P. 805-815.

19. Molne L., Verdrengh M., Tarkowski A. Role of neutrophil leukocytes in cutaneous infection caused by Staphylococcus aureus // Infection and immunity. – 2000. – Vol. 68, N 11. – P. 6162-6167.

20. Pease L.F., Elliott J.T., Tsai D.H., Zachariah M.R., Tarlov M.J. Determination of Protein Aggregation With Differential Mobility Analysis: Application to IgG Antibody // Biotechnol. Bioeng. – 2008. – Vol. 101. – P. 1214-1222.

21. Pross H., Eiding D. In vitro Studies of 'Antigenic Competition' II. Reconstitution of the immune defect and the relationship between antigen-induced suppression and non-specific enhancement // Immunology. – 1973. – Vol. 25. – P. 269.

22. Quie P.G., Cates K.L. Clinical conditions associated with defective polymorphonuclear leukocyte chemotaxis // Am. J. Pathol. – 1977. – Vol. 88, N 3. – P. 711-725.

23. Singh B.R., Chandra M., Agrawal R.K., Nagrajan B. Antigenic competition among different 'O' antigens of Salmonella enterica subspecies enterica serovars during hyperimmunization in pony mares // Indian. J. Exp. Biol. – 2006. – Vol. 44, N 12. – P. 1022-1025.

24. Yamada S. Chemiluminescence response of human phagocytes against IgG-opsonized staphylococci with and without protein A activities // Microbiol. Immunol. – 1990. – Vol. 34, N 3. – P. 221-229.

поступила в редакцию 22.05.2011

отправлена на доработку 06.06.2011

принята к печати 16.06.2011