

# ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ МОНОЦИТОВ КРОВИ В ОТВЕТ НА МЕТИЦИЛЛИНРЕЗИСТЕНТНЫЕ ШТАММЫ *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*

О.А. Коленчукова<sup>1,2</sup>, Н.И. Сарматова<sup>2</sup>, А.В. Мошев<sup>1</sup>

<sup>1</sup> НИИ медицинских проблем Севера ФИЦ КНЦ СО РАН, г. Красноярск, Россия

<sup>2</sup> Институт биологии и биотехнологии Сибирского федерального университета Минобрнауки РФ, г. Красноярск, Россия

**Резюме.** Цель: оценка фагоцитарной активности моноцитов крови при воздействии метициллинрезистентных штаммов *Staphylococcus aureus* относительно чувствительных штаммов. Объекты: моноциты крови, выделенные у 25 практически здоровых людей в возрасте от 25 до 45 лет и штаммы *S. aureus* устойчивые и чувствительные к действию оксациллина (метициллина) (MRSA/MSSA) в виде живой суспензии в концентрации  $10^6$  КОЕ/мл для индукции фагоцитов. **Материалы и методы.** Исследование фагоцитарной активности моноцитов проводили методом проточной цитометрии с использованием прямой иммунофлуоресценции цельной периферической крови с использованием моноклональных антител (Beckman Coulter, США), в следующей панели: CD14-PE/CD45-ECD/HLA-DR-PC5/CD16-PC7. Исследование интенсивности «респираторного взрыва» моноцитов осуществляли через определение активности люцигенин- и люминол-зависимой спонтанной и индуцированной хемилюминесценции. **Результаты и обсуждение.** В результате обнаружено, что при исследовании люминол-зависимой хемилюминесценции моноцитов в ответ на индукцию MRSA относительно MSSA, было выявлено снижение площади кривой в 3,5 раза. В люцигенин-зависимом процессе интенсивность хемилюминесценции при воздействии MRSA относительно MSSA снижена в 6 раз. Индекс активации (ИА) при воздействии MRSA относительно MSSA снижен в 1,1 раза. Снижение ИА доказывает низкий выброс АФК моноцитами в ответ на индукцию MRSA. В результате исследования кислороднезависимого фагоцитоза моноцитов в ответ на воздействие MRSA относительно MSSA было обнаружено снижение фагоцитарного числа, при этом фагоцитарный индекс достоверно повышался. Оценка активности субпопуляционного состава моноцитов при воздействии штаммов MRSA относительно MSSA показала увеличение фагоцитарного индекса субпопуляций CD14<sup>low</sup>CD16<sup>+</sup>-моноцитов и CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>-клеток в 1,5 раза, субпопуляций CD14<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup>-моноцитов в 3 раза, при этом фагоцитарное число субпопуляций моноцитов CD14<sup>low</sup>CD16<sup>+</sup>, CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> и CD14<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup> были снижены (1,4; 1,5; 4 раза соответственно). **Заключение.** Таким образом, субпопуляции моноцитов в отношении MRSA проявляют разную степень активизации, при повышенной интенсивности «респираторного взрыва». Также можно отметить, что классический тип моноцитов CD14<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup> в ответ на антиген активируется быстрее при низком фагоцитарном эффекте. Моноциты субпопуляций CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> и CD14<sup>low</sup>CD16<sup>+</sup> при низкой скорости ответа на MRSA фагоцитируют эффективнее.

**Ключевые слова:** фагоцитоз, моноциты крови, MRSA, MSSA, хемилюминесценция, респираторный взрыв.

## Адрес для переписки:

Коленчукова Оксана Александровна  
660022, Россия, г. Красноярск, ул. Партизана Железняка, 3г,  
ФГБНУ НИИ медицинских проблем Севера.  
Тел.: 8 (391) 228-06-83, 228-06-81, 228-06-62 (служебн.).  
Факс: 8 (391) 228-06-83.  
E-mail: kalina-chyikova@mail.ru

## Contacts:

Oksana A. Kolenchukova  
660022, Russian Federation, Krasnoyarsk, P. Zheleznyaka str., 3g,  
Scientific Research Institute of Medical Problems of the North.  
Phone: +7 (391) 228-06-83, 228-06-81, 228-06-62 (office).  
Fax: +7 (391) 228-06-83.  
E-mail: kalina-chyikova@mail.ru

## Библиографическое описание:

Коленчукова О.А., Сарматова Н.И., Мошев А.В. Функциональная активность моноцитов крови в ответ на метициллинрезистентные штаммы *Staphylococcus aureus* // Инфекция и иммунитет. 2020. Т. 10, № 3. С. 551–557. doi: 10.15789/2220-7619-PAO-1181

## Citation:

Kolenchukova O.A., Sarmatova N.I., Moshev A.V. Phagocytic activity of blood monocytes in response to methicillin-resistant strains of *Staphylococcus aureus* // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2020, vol. 10, no. 3, pp. 551–557. doi: 10.15789/2220-7619-PAO-1181

## PHAGOCYtic ACTIVITY OF BLOOD MONOCYTES IN RESPONSE TO METHICILLIN-RESISTANT STRAINS OF *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*

Kolenchukova O.A.<sup>a,b</sup>, Sarmatova N.I.<sup>b</sup>, Moshev A.V.<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Scientific Research Institute of medical problems of the North (SRI MPN), Krasnoyarsk, Russian Federation

<sup>b</sup> Krasnoyarsk Science Center of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Krasnoyarsk, Russian Federation

**Abstract.** Current study performed to estimate the phagocytic activity of blood monocytes of varying phenotypes exposed to MRSA and MSSA strains. Objects: Blood monocytes were collected from 25 healthy adults (age: 25–45 years). Live suspensions of MRSA/MSSA strains were used at concentration of  $10^6$  colony-forming units (CFU)/mL. *Methods.* Phagocytic functions were estimated by using fluorescein isothiocyanate (FITC)-labelled MRSA and MSSA strains followed by running flow cytometry on FC 500 series flow cytometer (Beckman Coulter, USA). Whole peripheral blood cells were directly labelled with immunofluorescently tagged monoclonal CD14-PE/CD45-ECD/HLA-DR-PC5/CD16-PC7 antibodies (Beckman Coulter, USA). Respiratory burst intensity was evaluated in monocytes by measuring activity of lucigenin- and luminol-dependent spontaneous and induced chemiluminescence. Monocytes were induced by using live suspension of MRSA/MSSA strains at a concentration of  $10^6$  CFU/mL. *Results and discussion.* While studying luminol-dependent monocyte activities after exposure to MRSA vs. MSSA, it was observed a 3.5-fold decreased curve square, whereas lucigenin-dependent chemiluminescence was increased by 6-fold. Compared to MSSA exposure, index of activation (IA) was decreased by 1.1-fold in response to MRSA exposure that was confirmed by lowered release of reactive oxygen species (ROS) from monocytes in response to MRSA exposure. Moreover, IRSS increased by 1.3-fold upon MRSA exposure. Examining monocyte oxygen-independent phagocytosis against MRSA vs. MSSA revealed significantly increased phagocytic number and concomitantly decreased phagocytic index. An evaluation of the activities of various monocyte subsets in response to MRSA vs. MSSA revealed increased phagocytic index by 1.5-fold for CD14<sup>low</sup>CD16<sup>+</sup> and CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> monocyte subsets as well as 3-fold for CD14<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup> monocytes. Counts for all phagocytic subsets were decreased (1.4-, 1.5- and 4-fold for CD14<sup>low</sup>CD16<sup>+</sup>, CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> and CD14<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup> monocytes, respectively). To summarize, intensity of the respiratory burst was lowered upon MRSA exposure and percentage of monocyte subsets. Overall deficiency of superoxide anion production was observed in response to MRSA. In contrast, oxygen-independent event revealed phenotypic changes in frequency of peripheral blood monocytes upon MRSA exposure. We observed that CD14<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup> classical monocytes were more rapidly activated. *Conclusion.* Thus, we concluded that CD14<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup> monocytes became more rapidly activated but exhibited less effective phagocytosis, whereas CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> and CD14<sup>low</sup>CD16<sup>+</sup> monocytes were more slowly activated and demonstrated stronger phagocytic activity.

**Key words:** phagocytosis, blood monocytes, MRSA, MSSA, chemiluminescence, respiratory explosion.

Фагоцитоз является одной из главных систем защиты организма от чужеродных агентов и играет важную роль при гнойно-воспалительных заболеваниях, особенно при стафилококковой инфекции. Активированные моноциты являются мощными эффекторами и запускают механизмы каскадных реакций, обеспечивающих развитие воспаления. Моноциты первыми мобилизуются в очаг воспаления, и от их фагоцитарной активности зависит элиминация возбудителя [1, 5, 16].

Метициллинрезистентный стафилококк (MRSA) продуцирует β-лактамазы и дополнительно имеет пенициллинсвязывающий белок (ПСБ2а) и следовательно, устойчив ко всем β-лактамам антибиотикам. Наиболее часто именно с ним связаны внутрибольничные (нозокомиальные) инфекции [4]. Известно, что уровень летальности при бактериемиях, вызываемых MRSA, достоверно выше, чем при инфекциях, обусловленных чувствительными штаммами. Установлено, что при стафилококковой инфекции киллинг бактерий осуществляется в основном с участием кислородзависимой ферментной системы. При этом, как

показывают результаты исследования, на этапах инициации инфекции реактивность этих бактерицидных систем зависит как от вида, так и от степени вирулентности возбудителя [4, 16]. Вместе с тем известно, что в процессе эволюции стафилококки приобрели способность к угнетению фагоцитарной функции лейкоцитов крови путем блокирования опсонизирующих веществ (комплемента и иммуноглобулина G), а также путем непосредственного токсического действия на фагоциты [7, 13, 17].

Несмотря на интенсивность исследований в данном направлении, остается все еще малоизученным весь спектр происходящих внутриклеточных событий, связанных с изменением фенотипических характеристик и функционирования моноцитов при воздействии бактериальных агентов, в том числе чувствительных и резистентных к действию антибиотиков [8].

Целью исследования является оценка фагоцитарной активности моноцитов крови при воздействии метициллинрезистентных штаммов *Staphylococcus aureus* относительно чувствительных штаммов.

## Материалы и методы

Объектами исследования служили моноциты крови, выделенные у 25 практически здоровых людей в возрасте от 25 до 45 лет, и штаммы *S. aureus* устойчивые к действию оксациллина/метициллина (MRSA) в виде живой суспензии в концентрации  $10^6$  КОЕ/мл. В качестве контроля использовались штаммы *S. aureus*, чувствительные к действию оксациллина/метициллина (MSSA), в аналогичной концентрации.

Для выявления метициллинрезистентности *S. aureus* использовали метод скрининга на агаре. Для проведения скрининга использовали агар Мюллера–Хинтон, содержащий 4% NaCl и 6,0 мкг/мл метициллина.

Микробную взвесь готовили методом прямого суспендирования из нескольких одноклеточных изолированных колоний стафилококков в стерильном физиологическом растворе и доводили до мутности 0,5 по МакФарланду ( $1,5 \times 10^8$  КОЕ/мл). Инокуляцию чашек с агаром проводили с помощью стерильного ватного тампона. Культуру наносили на ограниченную поверхность (диаметром 10–15 мм). Штаммы *S. aureus* инкубировали при температуре 35°C в течение 24 ч. После инкубации чашки просматривали. Появление видимого роста на месте нанесения культуры считали проявлением устойчивости данного штамма к оксациллину/метициллину. Исследование проводили при обязательном контроле роста испытуемых культур на агаре Мюллера–Хинтон с 4% NaCl без метициллина (культуры наносили так же, как на агар с метициллином). Параллельно с исследуемыми культурами тестировали также контрольные штаммы метициллинчувствительных и метициллинрезистентных стафилококков.

Исследование фагоцитарной активности моноцитов проводили методом проточной цитометрии с использованием прямой иммунофлуоресценции цельной периферической крови с использованием моноклональных антител (Beckman Coulter, США), меченных PE или RD1 (phycoerythrin), ECD (phycoerythrin-Texas Red-X), PC5 (phycoerythrin-cyanin 5) и PC7 (phycoerythrin-cyanin 7) в следующей панели: CD14-PE/CD45-ECD/HLA-DR-PC5/CD16-PC7. Распределение антител по каналам флуоресценции проводили в соответствии с принципами формирования панелей для многоцветных цитофлуориметрических исследований [12]. Подготовку образцов периферической крови для анализа осуществляли по стандартной методике [12]. Лизис эритроцитов проводили по безотмывочной технологии с использованием реагента VersaLyse (Beckman Coulter, США).

Анализ окрашенных клеток проводили на проточном цитофлуориметре «FC-500» (Beckman Coulter, США) [12]. В каждой пробе анализировали не менее 50 000 моноцитов. Уровень фагоцитоза определяли методом проточной цитометрии с помощью FITC-меченных (fluorescein isothiocyanate) бактериальных штаммов MRSA относительно MSSA [17]. Конъюгацию выполняли следующим образом: к бактериальному штамму (разведенному в бикарбонатном буфере, pH = 9,0) добавляли FITC (предварительно растворяли в ДМСО до концентрации 1 мкг/мл), инкубировали в темноте в течение 1 ч, трижды отмывали и по стандарту мутности доводили концентрацию бактерий до 1 млн/мл. К 100 мкл гепаринизированной крови добавляли 10 мкл FITC-меченной суспензии штаммов и инкубировали 30 мин при температуре 37°C. Для гашения адгезированных FITC-меченных бактерий добавляли раствор трипанового синего (0,2 мг/мл). Подсчитывали процент флуоресцирующих моноцитов (определяли как фагоцитарный индекс — ФИ) и средний уровень флуоресценции клеток (фагоцитарное число — ФЧ) [12].

Исследование интенсивности «респираторного взрыва» моноцитов осуществляли через определение активности люцигенин- и люминол-зависимых реакций спонтанной и индуцированной хемилюминесценции. Индукцию моноцитов осуществляли бактериальной культурой MRSA относительно MSSA в концентрации  $10^6$  КОЕ/мл. Хемилюминесцентная активность оценивалась в течение 90 мин на 36-канальном хемилюминесцентном анализаторе «CL3606» (Россия) [6, 14]. Определяли следующие характеристики: время выхода на максимум (Tmax), максимальное значение интенсивности (Imax), а также площадь под кривой (S) хемилюминесценции. Усиление хемилюминесценции, оценивали отношением площади индуцированной хемилюминесценции к площади спонтанной (Синд.<sub>MRSA</sub>/Спонт.) и (Синд.<sub>MSSA</sub>/Спонт.) определяли как индекс активации (ИА<sub>MRSA</sub>) и (ИА<sub>MSSA</sub>). Индекс относительного синтеза супероксид-радикала (ИОСС) является отношением площади люминол-зависимой реакции к люцигенин-зависимому процессу (Слюм./Слюц.) и определяет уровень синтеза первичных радикалов к вторичным.

Описание выборки производили с помощью подсчета медианы (Me) и интерквартильного размаха в виде 1 и 3 квартилей (Q<sub>25</sub> и Q<sub>75</sub>). Достоверность различий между показателями зависимых выборок оценивали по непараметрическому критерию Вилкоксона. Статистический анализ осуществляли в пакете программ Statistica 6.1 (StatSoft Inc., 2007).

## Результаты

Исследование интенсивности «респираторного взрыва» моноцитов включало оценку интенсивности выработки первичных и вторичных форм кислорода. С помощью хемилюминесцентного анализа, в котором активатором является люцигенин, определяли способность моноцитов к образованию супероксидного аниона ( $O_2^{\cdot-}$ ) и при активации люминолом — образование общего пула свободных радикалов кислорода. Хемилюминесцентное определение функциональной активности моноцитов базировалось на определении базовой активности (спонтанная реакция) и резервных возможностей клеток (при воздействии специфического индуктора в виде бактериальной суспензии MRSA относительно MSSA). Супероксидный анион-радикал образуется в результате ферментативных реакций и относится к первичным радикалам кислорода, являясь источником для вторичных радикалов ( $H_2O_2$ ,  $\cdot OH$ ,  $^1O_2$ ,  $HClO$ ) выделяемых фагоцитами.

При исследовании люминол-зависимой активности моноцитов в ответ на индукцию MRSA относительно MSSA было выявлено сни-

жение площади кривой в 3,5 раза (табл. 1). В люцигенин-зависимом процессе интенсивность хемилюминесценции при воздействии MRSA относительно MSSA увеличена в 6 раз. ИА при воздействии MRSA относительно MSSA снизился в 1,1 раза. Снижение ИА доказывает низкий выброс активных форм кислорода (АФК) моноцитами в ответ на индукцию MRSA. ИОСС при стимуляции MRSA был выше в 1,3 раза относительно MSSA.

В результате исследования фагоцитарной активности моноцитов в ответ на воздействие MRSA относительно MSSA было обнаружено снижение фагоцитарного числа, при этом фагоцитарный индекс достоверно повышался. Оценка активности популяционного состава моноцитов при воздействии штаммов MRSA относительно MSSA показала увеличение фагоцитарного индекса популяции  $CD14^{low}CD16^+$  — моноцитов и  $CD14^+CD16^+$ -клеток в 1,5 раза, популяции  $CD14^+CD16^-$ -моноцитов — в 3 раза, при этом фагоцитарное число популяции моноцитов  $CD14^{low}CD16^+$ ,  $CD14^+CD16^+$  и  $CD14^+CD16^-$  было снижено (в 1,4; 1,5; 4 раза соответственно) (табл. 2).

**Таблица 1. Показатели люминол- и люцигенин-зависимой хемилюминесценции моноцитов при воздействии штаммов *Staphylococcus aureus*, устойчивых и чувствительных к метициллину**

Table 1. Indicators of luminol- and lucigenin-dependent chemiluminescence of monocytes under the influence of MRSA and MSSA strains

Показатели Characteristics	Спонтанная реакция Spontaneous reaction	Индукцированная реакция Induced reaction	
		MRSA	MSSA
	N = 25		
	1	2	3
<b>Люминол-зависимая реакция</b> Luminol-dependent reaction			
<b>Tmax (с)</b>	2600 (573–4812)	2242,50 (1082–4740)	2880 (983–4692)
<b>I<sub>max</sub> (о.е.)</b>	631,5 (173–4190)	1506,5 (230–4666)	602,5 (240–4044)
<b>S<sub>max</sub> × 10<sup>4</sup> (о.е.)</b>	57,5 (34,4–1680)	319,4 (48,6–1620)	91,4 (46,1–1165) P <sub>2</sub> = 0,025
<b>ИА</b> IA		1,01 (0,96–1,52)	0,98 (0,9–1,28)
<b>Люцигенин-зависимая реакция</b> Lucigenin-dependent reaction			
<b>Tmax (с)</b>	860 (484–2603)	1416 (664–1576)	1609,5 (364–2519)
<b>I<sub>max</sub> (о.е.)</b>	194 (157–2030)	188 (147–2056)	1133,5 (158–2213) P <sub>2</sub> = 0,036
<b>S<sub>max</sub> × 10<sup>4</sup> (о.е.)</b>	44,9 (37,7–897,5)	33,9 (30,9–837,0)	135,6 (32,7–881,3)
<b>ИА</b> IA	1,10 (1–1,24)		1,21 (0,97–1,65) P <sub>2</sub> = 0,046
<b>ИОСС</b> IRSS	1,5 (1,01–1,4)	1,63 (0,96–4,1)	1,22 (0,72–1,7) P <sub>2</sub> = 0,026

**Примечание.** MRSA — метициллин-резистентный *S. aureus*; MSSA — чувствительный к метициллину *S. aureus*; Tmax — время максимальной активности; I<sub>max</sub> — максимальная интенсивность; S<sub>max</sub> — площадь под кривой; IA — индекс активации; IRSS — индекс относительного синтеза супероксидных радикалов.

Note. MRSA — methicillin-resistant *S. aureus*; MSSA — methicillin-susceptible *S. aureus*; Tmax — time of maximum activity; I<sub>max</sub> — maximum intensity; S<sub>max</sub> — area under the curve; IA — index of activation; IRSS — index of relative synthesis of superoxide radicals.

**Таблица 2. Показатели фагоцитарной активности моноцитов при воздействии штаммов *Staphylococcus aureus*, устойчивых и чувствительных к метициллину**

Table 2. Indicators of phagocytic activities of monocytes upon exposure to MRSA and MSSA strains

Показатели Characteristics	MRSA	MSSA	P
	N = 25		
Фагоцитарный индекс общей популяции моноцитов, % Phagocytic index of the general population of monocytes, %	34,92 (13,07–44,92)	12,4 (6,855–21,4)	< 0,001
Фагоцитарное число общей популяции моноцитов Phagocytic number of the general population of monocytes	55,7 (36,4–73,7)	103 (64,1–128)	< 0,001
Фагоцитарный индекс фенотипа CD14 <sup>low</sup> CD16 <sup>+</sup> , % Phagocytic index of CD14 <sup>low</sup> CD16 <sup>+</sup> monocytes, %	42,1 (27,58–60)	30,76 (22,22–40)	= 0,002
Фагоцитарный индекс фенотипа CD14 <sup>+</sup> CD16 <sup>+</sup> , % Phagocytic index of CD14 <sup>+</sup> CD16 <sup>+</sup> monocytes, %	50 (25–69,38)	33,33 (15,62–50)	= 0,009
Фагоцитарное число фенотипа CD14 <sup>+</sup> CD16 <sup>+</sup> Phagocytic number of CD14 <sup>+</sup> CD16 <sup>+</sup> monocytes	67,1 (37,7–178)	261 (128–364)	< 0,001
Фагоцитарный индекс фенотипа CD14 <sup>+</sup> CD16 <sup>-</sup> , % Phagocytic index of CD14 <sup>+</sup> CD16 <sup>-</sup> monocytes, %	36,57 (12,5–48,69)	12 (5,897–18,23)	< 0,001
Фагоцитарное число фенотипа CD14 <sup>+</sup> CD16 <sup>-</sup> Phagocytic number of CD14 <sup>+</sup> CD16 <sup>-</sup> monocytes	50,8 (31,6–58,7)	63,5 (46–82,5)	< 0,001

**Примечание.** MRSA — метициллин-резистентный *S. aureus*; MSSA — восприимчивый к метициллину *S. aureus*.Note. MRSA — methicillin-resistant *S. aureus*; MSSA — methicillin-susceptible *S. aureus*.

## Обсуждение

Следует отметить, что моноциты периферической крови, рассматривавшиеся долгое время в качестве единой группы клеток, на основании функциональной активности и экспрессии некоторых поверхностных антигенов подразделяются на несколько различных популяций [5, 9, 11, 16]. Так, циркулирующие моноциты по фенотипическим характеристикам можно разделить как минимум на две популяции, различающиеся по уровням экспрессии поверхностных молекул — компонента рецепторного комплекса для бактериального липополисахарида CD14 и высокоаффинного рецептора Fcγ CD16. Клетки, несущие на своей поверхности только CD14, принято называть «классическими моноцитами», так как в норме они составляют до 95% от общего числа циркулирующих моноцитов. Тогда как моноциты, обладающие фенотипом CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>, определяются как «неклассические» или «провоспалительные» [10]. Увеличение количества последних имеет место при различных патологических процессах, включая сепсис, острые и хронические воспалительные заболевания вирусной и бактериальной этиологии и т. д. [11, 15]. В ряде случаев выделяют дополнительную группу моноцитов с фенотипом CD14<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup> или CD14<sup>++</sup>CD16<sup>+</sup>, которые принято называть «промежуточными» [3]. Популяции моноцитов различаются не только по экспрессии CD14 и CD16, но и существенно отличаются друг от друга по своим функциональным свойствам, к числу которых относят профиль синтезируемых цитокинов и хемокинов, способ-

ность к фагоцитозу, а также синтезу и секреции активных форм кислорода и оксида азота [3, 9, 11]. В связи с этим функциональные особенности моноцитов могут также оцениваться и по уровню «респираторного взрыва», который характеризуется хемилюминесцентной активностью клеток при их взаимодействии с антигеном [5, 7].

Исследование показало, что в ответ на воздействие MRSA активируются и захватывают бактериальные частицы в большей степени «классические» моноциты с фенотипом CD14<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup>. В то же время в данной популяции выявлено повышение фагоцитарного индекса при воздействии MRSA относительно MSSA, при этом обнаружено, что фагоцитарное число снижено. Таким образом, можно отметить, что «классический» тип моноцитов с фенотипом CD14<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup> быстро активируется, при этом эффективность фагоцитоза снижена. «Неклассические» популяции моноцитов CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> и CD14<sup>low</sup>CD16<sup>+</sup> также принимают участие в фагоцитозе, но активируются медленнее и процент захваченных частиц намного меньше. Необходимо отметить, что именно популяция моноцитов с фенотипом CD14<sup>low</sup>CD16<sup>+</sup> обладает повышенной способностью мигрировать через эндотелий и дифференцироваться в дендритные клетки, которые инициируют развитие адаптивного иммунитета [3, 9].

Функциональная активность моноцитов осуществляется исходя из их популяционного состава в периферической крови. Популяция «классических» моноцитов представлена крупными клетками с высоким уровнем фагоцитарной активности. «Неклассические» моноциты

определяются как сравнительно небольшие клетки с низкой фагоцитарной и оксидазной активностью и, соответственно, с пониженным уровнем «респираторного взрыва». «Промежуточный» тип моноцитов определяется как «провоспалительный» в связи с активной продукцией провоспалительных цитокинов [2, 8, 11, 14].

При воздействии MRSA значительно изменяется хемилюминесцентная активность моноцитов периферической крови. Обнаружено, что при индукции «респираторного взрыва» с помощью MRSA относительно MSSA снижается работа НАДФН-оксидазы. Также при индукции MRSA снижена интенсивность хемилюминесценции при снижении индекса активации в люцигенин-зависимой хемилюминесценции, который характеризует уровень метаболических резервов для синтеза активных форм кислорода [14]. Цитотоксическая активность моноцитов определяется уровнем продукции как первичных (супероксидный

анион), так и вторичных активных форм (гидроксильный радикал, перекись водорода и др.) кислорода. В люминол-зависимом процессе увеличение площади под кривой моноцитов крови при воздействии MRSA определяет повышенный уровень «респираторного взрыва», что в целом характеризует цитотоксическую активизацию моноцитов крови в ответ на воздействие золотистого стафилококка, устойчивого к метициллину.

Таким образом, при индукции MRSA установлены изменения в фенотипическом составе и интенсивности «респираторного взрыва» моноцитов периферической крови. Уровень выброса вторичных радикалов в общей фракции моноцитов крови при индукции MRSA повышен при снижении выработки первичных кислородных форм, что может привести к дисбалансу метаболизма клетки. Можно предположить, что при индукции золотистым стафилококком (в большей степени MRSA) функциональная активность моноцитов подавлена.

## Список литературы/References

1. Коленчукова О.А., Игнатова И.А., Смирнова С.В., Капустина Т.А., Кин Т.Н. Особенности микрофлоры слизистой оболочки носа у больных аллергическим риносинуситом // Вестник оториноларингологии. 2008. Т. 5. С. 33–36. [Kolenchukova O.A., Ignatova I.A., Smirnova S.V., Kapustina T.A., Kin T.N. Properties of nasal mucosal microflora in patients with allergic rhinosinusitis. *Vestnik otorinolaringologii = Bulletin of Otorhinolaryngology*, 2008, vol. 5, pp. 33–36. (In Russ.)]
2. Коленчукова О.А., Сарматова Н.И., Механизмы воздействия устойчивых к метициллину штаммов *Staphylococcus aureus* на функциональное состояние нейтрофильных гранулоцитов // Антибиотики и химиотерапия. 2014. Т. 59, № 11–12. С. 20–23. [Kolenchukova O., Sarmatova N. Mechanisms of influence of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* on functional state of neutrophilic granulocytes. *Antibiotiki i khimioterapiia*. 2014, vol. 59, no. 11–12, pp. 20–23. (In Russ.)]
3. Appleby L.J., Nausch N., Midzi N., Mduluzi T., Allen J.E., Mutapi F. Sources of heterogeneity in human monocyte subsets. *Immunol. Lett.*, 2013, vol. 1, no. 152, pp. 32–41. doi: 10.1016/j.imlet.2013.03.004
4. Chen Y., Lu S., Zhang Y., Yu J., Deng L., Chen H., Zhang Y., Zhou N., Yuan K., Yu L., Xiong Z., Gui X., Yu Y., Min W. TLR2 agonist Pam3CSK4 enhances the antibacterial functions of GM-CSF induced neutrophils to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Microb. Pathog.*, 2019, vol. 130, pp. 204–212. doi: 10.1016/j.micpath.2019.02.030
5. Flack C.E., Zurek O.W., Meishery D.D., Pallister K.B., Malone C.L., Horswill A.R., Voyich J.M. Differential regulation of staphylococcal virulence by the sensor kinase SaeS in response to neutrophil-derived stimuli. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 2014, vol. 13, no. 111, pp. 19–25. doi: 10.1073/pnas.1322125111
6. Gordon S. Targeting a monocyte subset to reduce inflammation. *Circ. Res.*, 2012, vol. 12, no. 110, pp. 1546–1548. doi: 10.1161/RES.0b013e31825ec26d
7. Hristov M., Schmitz S., Nauwelaers F., Weber C. A flow cytometric protocol for enumeration of endothelial progenitor cells and monocyte subsets in human blood. *J. Immunol. Methods*, 2012, vol. 1–2, no. 381, pp. 9–13. doi: 10.1016/j.jim.2012.04.003
8. Kim H.K., Cheng A.G., Kim H.Y., Missiakas D.M., Schneewind O. Nontoxic protein A vaccine for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in mice. *J. Exp. Med.*, 2010, vol. 207, no. 9, pp. 1863–1870. doi: 10.1084/jem.20092514
9. Krogh A.Kh., Haaber J., Bochsén L., Ingmer H., Kristensen A.T. Aggregating resistant *Staphylococcus aureus* induces hypocoagulability, hyperfibrinolysis, phagocytosis, and neutrophil, monocyte, and lymphocyte binding in canine whole blood. *Vet. Clin. Pathol.*, 2018, vol. 47, no. 4, pp. 560–574. doi: 10.1111/vcp.12679
10. Kolonitsiou F., Papadimitriou-Olivgeris M., Spiliopoulou A., Drougka E., Jelastopulu E., Anastassiou E.D., Spiliopoulou I. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST80 induce lower cytokine production by monocytes as compared to other sequence types. *Front Microbiol.*, 2019, vol. 9: 3310. doi: 10.3389/fmicb.2018.03310
11. Lauvau G., Chorro L., Spaulding E., Soudja S.M. Inflammatory monocyte effector mechanisms. *Cell Immunol.*, 2014, vol. 1–2, no. 291, pp. 32–40. doi: 10.1016/j.cellimm.2014.07.007
12. Luider J., Cyfra M., Johnson P., Auer I. Impact of the new Beckman Coulter Cytomics FC 500 5-color flow cytometer on a regional flow cytometry clinical laboratory service. *Lab. Hematol.*, 2004, vol. 10, pp. 102–108. doi: 10.1532/LH96.04121
13. Maecker H., McCoy P., Nussenblatt R. Standardizing immunophenotyping for the human immunology project. *Nat. Rev. Immunol.*, 2012, vol. 12, pp. 191–200. doi: 10.1038/nri3158
14. Nocca G., De Sole P., Gambarini G., De Palma F., Parziale V., Giardina B., Lupi A. Alteration of monocytic cell oxidative burst caused by methacrylic monomers present in dental materials: a chemiluminescence study. *Luminescence.*, 2006, vol. 3, no. 21, pp. 202–206. doi: 10.1002/bio.909

15. Palmqvist N., Foster T., Tarkowski A., Josefsson E. Protein A is a virulence factor in Staphylococcus aureus arthritis and septic death. *Microbial Pathogenesis*, 2002, vol. 5, no. 33, pp. 239–249. doi: 10.1006/mpat.2002.0533
16. Shahkarami F., Rashki A., Rashki Ghalehnoo Z., Jundishapur J. Susceptibility and plasmid profiles of methicillin-resistant Staphylococcus aureus and methicillin-susceptible S. aureus. *Microbiol.*, 2014, vol. 7, no. 7, pp. 37–42.
17. Streh C., Fangradt M., Fearon U., Gaber T., Buttgerit F., Veale D.J. Hypoxia: how does the monocytomacrophagesystem respond to changes in oxygen availability? *J. Leukoc. Biol.*, 2014, vol. 2, no. 95, pp. 233–241. doi: 10.1189/jlb.1212627

---

**Авторы:**

**Коленчукова О.А.**, д.б.н., доцент, ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярно-клеточной физиологии и патологии ФГБНУ НИИ медицинских проблем Севера, г. Красноярск, Россия;

**Сарматова Н.И.**, к.б.н., доцент кафедры биотехнологии Института биологии и биотехнологии Сибирского федерального университета Минобрнауки РФ, г. Красноярск, Россия;

**Мошев А.В.**, научный сотрудник лаборатории клеточно-молекулярной физиологии и патологии, ФГБНУ ФИЦ Красноярский научный центр СО РАН, обособленное подразделение НИИ медицинских проблем Севера, г. Красноярск, Россия.

**Authors:**

**Kolenchukova O.A.**, PhD, MD (Biology), Associate Professor, Leading Researcher, Laboratory of Molecular Cell Physiology and Pathology, Scientific Research Institute of Medical Problems of the North, Krasnoyarsk, Russian Federation;

**Sarmatova N.I.**, PhD (Biology), Associate Professor, Department of Biotechnology, Institute of Biology and Biotechnology, Siberian Federal University, Ministry of Education and Science of the Russian Federation, Krasnoyarsk, Russian Federation;

**Moshev A.V.**, Researcher, Laboratory of Cellular and Molecular Physiology and Pathology, Krasnoyarsk Science Center of the Siberian Branch of the RAS, Scientific Research Institute of Medical Problems of the North, Krasnoyarsk, Russian Federation.

---

Поступила в редакцию 26.07.2019  
Отправлена на доработку 18.12.2019  
Принята к печати 14.03.2020

---

Received 26.07.2019  
Revision received 18.12.2019  
Accepted 14.03.2020