

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ  
**«БЕЛГОРОДСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ  
ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»**  
( Н И У « Б е л Г У » )

ИНСТИТУТ ИНЖЕНЕРНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ И ЕСТЕСТВЕННЫХ НАУК  
КАФЕДРА БИОТЕХНОЛОГИИ И МИКРОБИОЛОГИИ

**ИССЛЕДОВАНИЕ МИКРОФЛОРЫ ВНУТРЕННЕЙ СРЕДЫ  
ЧЕЛОВЕКА, КАК МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЙ ПОКАЗАТЕЛЬ  
ИММУНИТЕТА**

Магистерская диссертация

обучающегося по направлению подготовки

06.04.01 Биология «Микробиология»

очной формы обучения,

группы 07001541

Саеди Хайдер Юсиф

Научный руководитель  
д.б.н., доц. Батлуцкая И.В..

Рецензент  
д.б.н., доц. Чернявских С.Д.

БЕЛГОРОД 2017

## Содержание

Введение	3
Глава 1	5
1.1. Характеристика внутренней среды организма.	5
1.2. Функции внутренней среды	6
1.3. Иммунитет	11
1.4. Микрофлора внутренней среды организма	18
1.5. Заболевания крови как фактор снижения иммунитета	23
Глава 2	28
2.1. Материалы исследования	28
2.2. Методы исследования.	28
Глава 3. Результаты и обсуждение	36
Заключение	38
Список использованной литературы	40
Приложение	44

## Введение

Показатели иммунного статуса организма человека являются определяющими при мониторинге здоровья в современных популяциях различных географических зон. Исследования иммунитета проводится на уровне внутренней среды, под которой понимается, прежде всего, комплекс структурно обособленных участков тела, ни при каких обстоятельствах, кроме механических повреждений, не соприкасающихся с окружающим миром. У организма человека внутренняя среда представлена кровью, межклеточной и синовиальной жидкостью, ликвором и лимфой. [39]. Доказано, что во внутренней среде организма поддерживается постоянство физических и химических свойств, сохраняющееся даже при очень сильных внешних воздействиях на организм, то и все клетки организма существуют в относительно постоянных условиях. Постоянство внутренней среды организма называется гомеостазом.

Результаты исследований организма человека последних лет показали, что наше тело содержит огромное количество разнообразной микрофлоры, которая включает в себя симбиотические микроорганизмы, микроорганизмы постоянно присутствующие на коже, слизистых оболочках, в полостях тела, которые соприкасаются непосредственно с внешней средой. Так как ткани внутренней среды в норме полностью ограничены от контакта с окружающей средой, они не содержат посторонних организмов. При различных заболеваниях и механических повреждениях во внутреннюю среду могут заноситься различные микроорганизмы. Для многих групп микроорганизмов такие условия оказываются благоприятными и способствуют быстрому размножению.

Внимание иммунологов привлекает тот факт, что в организме человека имеется ряд защитных механизмов, способных предотвращать распространение инфекции. Бактериальное и микологическое нарушение

иммунитета защитные функции внутренней среды снижаются, что ведет к развитию инфекции.

Данные микробиологических и микологических исследований показали, что инфекционные осложнения способны существенно снижать эффективность высокотехнологичных операций и уменьшать сроки выживаемости пациентов с тяжелыми вторичными иммунодефицитными состояниями. Основными факторами риска их возникновения являются тяжесть основного заболевания и выраженность иммунодефицита.

Существует аргументированный спектр воззрений на клиническое значение присутствия жизнеспособных микроорганизмов в крови человека. Факт выявления живых бактерий или грибов в крови пациентов является возможным признаком развития сепсиса и других серьезных осложнений на фоне основного заболевания. Доказанные особенности видового состава возбудителей бактериемии у больных с вторичным иммунодефицитом и другими нарушениями иммунного статуса изучены недостаточно [9,10,11].

Подробный анализ современной отечественной литературы позволили сформулировать цель проведенного исследования: Провести анализ микрофлоры внутренней среды организма человека с точки зрения показателя иммунитета.

Поставленная цель была полностью реализована в ходе решения следующих задач:

1. Провести микробиологический анализ крови здоровых людей и людей, страдающих хроническим лимфобластным лейкозом и острым миелобластным лейкозом (поли)
2. Выявить характерных представителей микрофлоры, присутствующих в крови людей, страдающих заболеваниями системы крови.
3. Выявить зависимость показателя иммунитета и микроорганизмов, присутствующих в образцах внутренней среды человека.

## **Глава 1.**

### **1.1. Характеристика внутренней среды организма.**

Общеизвестен фат того, что внутренняя среда организма представлена тканевой (интерстициальной) жидкостью, лимфой и кровью, состав и свойства, которых теснейшим образом связаны между собой. В настоящее время все больше ученых и врачей склоняются к тому, что истинной внутренней средой организма является тканевая жидкость, так как лишь она контактирует с клетками организма. Кровь же, соприкасаясь непосредственно с эндокардом и эндотелием сосудов, обеспечивает их жизнедеятельность и лишь косвенно через тканевую жидкость вмешивается в работу всех без исключения органов и тканей. Через сосудистую стенку в кровотоке транспортируются гормоны и различные биологически активные соединения.

Вода в составе тканевой жидкости, лимфы и крови в организме человека вода составляет 75% от массы тела. Для человека массой тела 70 кг тканевая жидкость и лимфа составляют до 30% (20 - 21 л), внутриклеточная жидкость - 40% (27 - 29 л) и плазма - около 5% (2,8 - 3,0 л).

Составляющие внутренней среды находятся в состоянии постоянного обмена между веществами и водой, несущей растворенные в ней продукты обмена, гормоны, газы, биологически активные вещества. Следовательно, внутренняя среда организма представляет собой единую систему гуморального транспорта, включающую общее кровообращение и движение в последовательной цепи: кровь - тканевая жидкость - ткань (клетка) - тканевая жидкость - лимфа - кровь. Значение внутренней среды организма состоит в том, что из нее ткани получают все необходимое для своей жизнедеятельности и отдают в нее метаболиты (продукты обмена веществ) [31].

Совокупность таких обменных процессов в основе гомеостазиса как относительного постоянства состава и физико-химических свойств

внутренней среды организма. Гомеостазис характеризуется рядом биологических констант.

Под биологическими константами понимаются, прежде всего, устойчивые количественные показатели состава и физико-химических свойств организма. В дополнение к ним температуру тела, величину кровяного давления, уровень глюкозы в крови, рН крови, величину осмотического давления.

Гомеостатическая регуляция осуществляется изменением деятельности органов систем организма посредством нервной системы и эндокринных желез

Внутренние и внешние барьеры формируют индивидуальные особенности организма. К внешним барьерам относятся кожа, слизистые оболочки, эпителий пищеварительного тракта, легких. За счет внешних барьеров внутренняя среда организма отделена от внешней среды. К внутренним барьерам относятся гистогематические барьеры (крово-тканевые). Они обеспечивают постоянство состава и физико-химических свойств внутренней среды организма. Основной структурой гистогематических барьеров является эндотелий капилляров. Функции гистогематических барьеров: 1) защитная; 2) регуляторная. Виды гистогематических барьеров: 1) собственно гистогематический; 2) гематоэнцефалический (крово-мозговой); 3) плацентарный 4) гематоофтальмический; 5) гемато-пульмональный; 6) гемато-ренальный; 7) гемато-ликворный; 8) гемато-лиенальный. [19]

## **1.2. Функции внутренней среды**

Часть внутренней среды организма, которая заполняет все пространство между клетками - тканевая жидкость. К таким видам специалисты относят жидкость плевральной полости, сердечной сумки, спинномозговую жидкость и др.

Формирование тканевой жидкости происходит из плазмы крови, проникающей в интерстициальное пространство через стенки капилляров, при этом одна ее часть возвращается назад, а другая часть остается между клетками тканей.

Лимфатические капилляры служат частичным вместилищем тканевой жидкости, отсюда она попадает в сосуды, образуя лимфу, и проходя через лимфоузлы, снова попадает в кровоток.

Как правило, из-за своего постоянного перемещения тканевая жидкость не накапливается вокруг клеток. Если же по какой-то причине жидкость перестает возвращаться в кровь, возникают отеки.

Данная часть внутренней среды очень мало содержит белковых компонентов (1,5 г на 100 мл), и по своему химическому составу сильно напоминает плазму, хотя отличается количеством электролитов, ферментов и метаболитов.

Клеточная характеристика тканевой жидкости определяется спецификой определенных органов, соответствует их особенностям, но главным образом она состоит из воды, растворенных питательных веществ (сахаров, солей, аминокислот, ферментов и прочих), кислорода, углекислого газа и продуктов жизнедеятельности клеток.

Тканевая жидкость является своеобразным посредником между кровеносными сосудами и клетками организма. Обмен веществ, который постоянно совершают клетки, поглощая кислород и питательные вещества и отдавая углекислый газ и другие продукты жизнедеятельности, может быть реализован при условии растворенного состояния клеточной мембраны.

Такую ответственную роль выполняет тканевая жидкость, которая окружает клетки и омывает их. При этом клетки из тканевой жидкости получают все необходимое питание и кислород, а ей возвращают отработанные вещества. Из тканевой жидкости все продукты клеточного обмена дальше проникают в кровеносное русло.

Объём тканевой жидкости у взрослого человека составляет около 23-29% от общей массы тела, в среднем это около 20 литров.

Важнейшая составляющая часть внутренней среды – лимфа образуется в тканях организма из интерстициальной (тканевой) жидкости. Продвигаясь по сосудам лимфатической системы, она проходит через лимфатические узлы, где в нее поступают форменные элементы - лимфоциты.

Основные функции лимфы заключаются в следующем:

1. Поддержание постоянства состава и объема тканевой жидкости.
2. Возврат белка из межклеточной среды в кровеносное русло.
3. Участие в перераспределении жидкости в организме.
4. Обеспечение гуморальной связи между тканями и органами, лимфоидной системой и кровью.
5. Всасывание и транспорт продуктов гидролиза пищи, особенно жиров, из желудочно-кишечного тракта в кровь.
6. Обеспечение механизма иммунитета.

Усредненные цифры по объему циркулирующей лимфы в среднем составляет 1,5-2 л. Лимфа состоит из лимфоплазмы и форменных элементов - лимфоцитов и тромбоцитов, а эритроциты у здорового человека в лимфе отсутствуют.

Состав периферической лимфы в разных лимфатических сосудах различных органов и тканей может значительно различаться. Для примера: лимфа, оттекающая от кишечника, богата жирами, а лимфа, оттекающая от печени, содержит много белков и углеводов. Изменение состава лимфы связано с изменениями состава плазмы крови и с особенностями обмена веществ в тканях.

По визуальным и биохимическим показателям лимфа (лат. *lympha* - влага) представляет собой слегка желтоватую жидкость белковой природы, протекающую в лимфатических капиллярах и сосудах. Она состоит из лимфоплазмы (*plasma lymphae*) и форменных элементов. По химическому составу лимфоплазма близка к плазме крови, но содержит меньше белков.



Среди фракций белка альбумины преобладают над глобулинами. Лимфа образуется из тканевой жидкости, за сутки ее вырабатывается у взрослого человека около 2 л. В лимфе содержится белок в количестве 20 г/л, что примерно в 10 раз меньше, чем в крови. Лимфа циркулирует по специальным лимфатическим сосудам. Для ее циркуляции в стенках некоторых лимфатических сосудов есть гладкомышечные клетки, которые ритмически сокращаются и толкают лимфу в определенном направлении. Важнейшим двигателем для лимфы являются сокращения скелетных мышц, при этом скорость движения лимфы при физической работе может в 15 раз превышать аналогичный показатель у находящегося в покое человека. В целом скорость движения лимфы сравнительно мала.

Накапливается в лимфатических капиллярах тканей и органов, куда под влиянием различных факторов, в частности осмотического и гидростатического давления, лимфа из тканей постоянно поступают различные компоненты лимфоплазмы. Из капилляров лимфа перемещается в периферические лимфатические сосуды, по ним - в лимфатические узлы, затем в крупные лимфатические сосуды и вливается в кровь. Состав лимфы постоянно меняется. Различают лимфу периферическую (до лимфатических узлов), промежуточную (после прохождения через лимфатические узлы) и центральную (лимфа грудного и правого лимфатического протоков). Процесс лимфообразования тесно связан с поступлением воды и других веществ из крови в межклеточные пространства и образованием тканевой жидкости [7].

Отличительной особенностью лимфатической системы является то, что она в отличие от кровеносной не имеет центрального «насоса» - сердца, устроена по другому принципу: лимфатические сосуды не представляют собой замкнутой системы, а в некоторых зонах сходятся в большом количестве и образуют лимфатические узлы. Эта анатомическая особенность отражается в том, что воспалительные процессы в организме часто ведут к увеличению близлежащих к очагу воспаления лимфатических узлов, так как

именно там проходит последняя стадия созревания Т-лимфоцитов, необходимых для борьбы с микробами.

В тоже время, основная функция лимфатической системы - удаление из тканей избытка воды и тех продуктов метаболизма, которые там не используются клетками. Доказано, что лимфа транспортирует всосавшиеся в кишечнике питательные вещества, в частности жиры. Важной функцией лимфы является ее связь с активностью белых клеток крови (лимфоцитов), которые по лимфатическим сосудам разносятся ко всем клеткам тела и к местам проникновения в организм болезнетворных микробов.

Приоритетную роль в иммунных реакциях, особенно в детском возрасте, играют так называемые лимфатические железы, разбросанные по всему организму. Данные железы включают тимус (вилочковая железа), миндалины (гланды), аденоиды, аппендикс и целый ряд других. Большинство лимфатических желез, как и лимфоидная ткань в целом, по мере взросления и формирования специфического иммунитета утрачивают свое значение и уменьшаются в размерах, частично заменяясь соединительной тканью [1].

Цереброспинальная жидкость формирует в ликворную систему, которой относят желудочки мозга, цистерны основания мозга, спинальные субарахноидальные пространства, конвекситальные субарахноидальные пространства. В норме объем цереброспинальной жидкости (которую также принято называть ликвором) у здорового взрослого человека составляет 150-160 мл. [43,44].

Биохимические показатели состава ликвора сходны с плазмой крови. 90% приходится на воду и 10% сухого остатка. Аминокислоты (20-25), белки (около 14 фракций), ферменты, принимающие участие в метаболизме нервной системы, сахар, холестерин, молочная кислота и около 15 микроэлементов также входят в состав этой системы. В ликворе определяются нейромедиаторы: ацетилхолин, норадреналин, дофамин, серотонин; гормоны – мелатонин, эндофины, энкефалины, кинины.

Показаны следующие функции ликвора:

1. Механическая защита структур центральной нервной системы;
2. Экскреторная – с жидкостью удаляются продукты метаболизма;
3. Транспортная – ликвор служит для переноса метаболитов, биологически активных веществ, медиаторов, гормонов;
4. Дыхательная – снабжает кислородом мозговые оболочки и нервную ткань;
5. Гомеостаз – поддерживает стабильное окружение мозга, нивелирует краткосрочные изменения состава крови, поддерживает рН на определенном уровне, осмотическое давление в клетках мозга, обеспечивает нормальную возбудимость ЦНС, создает внутричерепное давление;
6. Иммунная – участвует в создании специфического иммунобиологического барьера ЦНС.

Данная важная жидкость секретируется в основном эпителием сосудистых сплетений боковых, III-го и IV-го желудочков [20,41]

### **1.3. Иммунитет**

Иммунитет является одним из важнейших звеньев защиты организма от воздействия факторов окружающей среды и его состояние в значительной мере определяет здоровье человека [25]. Современный широкомасштабный мониторинг показал большую роль абиотических и биотических факторов среды разной природы и происхождения существенно воздействуют на степень выраженности иммунных сил организма человека. Важной среди таких функций организма, обеспечивающей и определяющих сопротивляемость инфекционной нагрузке, выступает неспецифический иммунитет. Этот вид комплексной защитной реакции часто оценивают по бактерицидной активности кожного покрова и составу микрофлоры полости рта.

Суммарный комплексный иммунитет принято характеризовать как способность организма к защите от патогенных факторов. Таким образом, иммунитет - достаточно широкоспекторная форма различных способов

защиты организма от разного плпна факторов среды. Доказано, что самая установившаяся и в то же время, действенная - это неспецифический иммунитет (конституциональная резистентность или врожденный иммунитет,). Данный способ защиты образуется у большинства видов и отличается следующими признаками: обнаружен у организмов, не подвергавшихся иммунизации; имеется у всех представителей вида с рождения и сохраняется в течение всей жизни; отличается большой ферментативной активностью, но слабой специфичностью действия. Такой иммунитет обеспечивается барьерными и антимикробными свойствами слизистых оболочек и кожи, клеточными факторами (фагоцитарных реакций макрофагов и полиморфеоядерных лейкоцитов), гумаральными факторами (лизоцимом, системой комплимента, бета-лизином, интерфероном и другими противомикробными белками). Доминирующая роль анатомо-физиологического барьера – недопускание попадания бактериального фактора в организм. Такая защита состоит из ряда барьерных систем, они проявляются как на поверхностях покровных тканей, но и во внутренней среде организма при распространении микроорганизмов и молекулярных факторов их патогенности.

Роль внутренней среды организма с точки зрения общего иммунитета определяет направление компенсаторно-приспособительных процессов при адаптации человека к веками сложившимся неблагоприятным факторам среды современной цивилизации [33].

#### Неспецифическая резистентность и иммунитет

Анализируя роль форменных элементов крови в иммунитете, следует выделить основную роль лейкоцитов. Определяющее значение лейкоцитов – их задействование в защитных реакциях организма при взаимодействии с чужеродными агентами, способными нанести клеткам и организму в целом вред. Выделяют индивидуальную защиту, или иммунитет, и неспецифическую сопротивляемость организма. Последняя, в отличие от

иммунитета, направлена на уничтожение бактериального или иного чужеродного агента. Такой вид сопротивляемости обеспечивается фагоцитозом и пиноцитозом, системой комплемента, естественной цитотоксичностью, действием интерферонов. лизоцима, бета-лизинов и других гуморальных факторов защиты [14].

Специфические анатомо-морфологические особенности лейкоцитов – способность к фагоцитозу помогают понять главенствующий принцип иммунитета: это поглощение чужеродных частиц или клеток и их дальнейшее уничтожение. Явление фагоцитоза открыто И. И. Мечниковым, за что ему была присуждена Нобелевская премия 1908 г. Фагоцитоз присущ нейтрофилам, эозинофилам, моноцитам и макрофагам.

Ученый И.И. Мечников выделил следующие стадии фагоцитоза:

- 1) сближение фагоцита и фагоцитируемого объекта, или лиганда;
- 2) контакт с мембраной фагоцита;
- 3) поглощение лиганда или микроорганизма;
- 4) уничтожение фагоцитированного объекта путем переваривания.

Для лейкоцитов характерна амебовидная подвижность. Взаимодействие с субстратом, к которому движется лейкоцит, носит название адгезии. Показано, что к фагоцитозу способны только фиксированные, или адгезированные, лейкоциты.

Превращение фагоцитами жидких и твердых частиц обеспечивает возможность воспринимать сигналы - осуществлять хемотаксисы и мигрировать в направлении их воздействия. данный вид таксисов получил название хемокинез. Доказано химическое воздействие на активность лейкоцитов. Такие химические соединения образуют сопутствующие продукты распада соединительной ткани, некоторые факторы свертывания крови и фибринолиза, фрагменты иммуноглобулинов, активных компонентов комплемента, простагландины, лейкотрины, лимфокинины и монокинины. Экспериментальное изучение хемотаксисов показало, что фагоцит целенаправленно двигается в сторону повреждающего агента. Показано

непосредственное влияние концентрации хемоаттрактанта. Она определяет количество и скорость движения фагоцитов. Чем больше концентрация, тем большее число фагоцитов устремляется в зону повреждения и тем с большей скоростью они движутся. Контакт с хемоаттрактантом фагоцита осуществляется при помощи специфических гликопротеиновых образований - рецепторов; их количество на одном нейтрофиле достигает  $2 \times 10^3 - 2 \times 10^5$ . Передвижение фагоцитов происходит в результате взаимодействия актина и миозина и сопровождается выдвиганием псевдоподий, которые служат точкой опоры при перемещении фагоцита. Присоединяясь к субстрату, ложноножка передвигает фагоцит на новое место. Двигаясь, таким образом, клетка проходит через стенку капилляра; прилипая к эндотелию, она выпускает ложноножку и ею пронизывает эндотелий сосуда. В это образование постепенно «перетекает» тело лейкоцита. После этого лейкоцитарная клетка отделяется от стенки сосуда и может мигрировать в тканях [14].

Контакт фагоцита и фагоцитируемого объекта может быть обусловлен разностью электрических зарядов, повышением гидрофобности или гидрофильности чужеродной частицы, наличием на её поверхности химических соединений, способных специфически связываться с мембранной манозой или инсулином макрофага. Чаще всего контакт обеспечивается характерными веществами, получившими название опсонинов, которые значительно усиливают фагоцитоз. Такие соединения формируют иммунные комплексы, отдельные фрагменты системы комплемента: агрегированные белки, С-реактивный белок, фиброанектины и другие вещества. Более плотно опосредованный фагоцитоз изучен с участием гликопротеина фиброанектина (молекулярная масса которого 440000), обладающего высокой «клейкостью», что облегчает взаимодействие фагоцита и лиганда. Фибронектин находится в нерастворимой форме в соединительной ткани и в растворимой в альфа-2-глобулиновой фракции плазмы. Дополнительно к этому, во взаимодействии фагоцита с

фагоцитируемым объектом принимают участие белок ламинин, который близок по строению к фибронектину, и ионы  $\text{Ca}^{2+}$  и  $\text{Mg}^{2+}$ . Данные взаимодействия обусловлены имеющимися на мембране фагоцитов специфическими рецепторами. При взаимодействии лиганда с рецептором, возникает его конформация, и сигнал передается на фермент, связанный с рецептором в единый комплекс, благодаря чему осуществляется поглощение фагоцитируемого объекта.

В настоящее время известны несколько механизмов поглощения, однако, все они сводятся к заключению лиганда в мембрану фагоцита. Формирующаяся в результате такого взаимодействия фагосома передвигается к центру клетки, где сливается с лизосомами, так формируется фаголизосома. В этой структуре фагоцитируемый объект как правило гибнет. Это так называемый завершённый фагоцитоз. Но нередко встречается незавершённый фагоцитоз, когда фагоцитируемый объект может жить и развиваться в фагоците. Такое развитие событий наблюдается при таких инфекционных заболеваниях как туберкулезе, гонорее, менингококковая и вирусные инфекции.

Завершающая стадия фагоцитоза - уничтожение лиганда. Основой биохимического воздействия фагоцитов являются пероксид водорода, и свободные радикалы - продукты частичного восстановления кислорода. Эти соединения вызывают пероксидное окисление жиров, белков и нуклеиновых кислот, вследствие чего повреждается мембрана клетки.

При взаимодействии рецепторов с фагоцитируемым объектом наступает активация оксидаз – реакционноактивных катализирующих веществ, передающих электроны на атомы кислорода и отнимающих их у восстановленных молекул. В результате формирования фаголизосомы происходит стремительное усиление окислительных процессов внутри данного мембранного образования, в результате чего наступает гибель бактерий. При фагоцитозе утилизируемый клетками кислород превращается в супероксидный анион-радикал ( $\text{O}_2^-$ ). При окислении НАДФхН<sub>2</sub> в больших

количествах генерируется пероксид водорода, обладающий сильным окислительным действием. Клетки фагоцитов характеризуются универсальным свойством высвобождать  $O_2^-$  и другие супероксидные радикалы. Фактор или бактериальный агент, задействованный в фагоцитозе, заключаются в фагосому или фаголизосому, по системе микротрубочек транспортируется содержимое гранулы образованные в результате метаболизма. Доказано, что миелопероксидаза нейтрофилов, окисляя мембранные белки, способна инактивировать грамположительные и грамотрицательные бактерии, вирусы, грибки, микоплазмы при обязательном участии галогенов (анионов  $Cl^-$  и пероксида водорода ( $H_2O_2$ )). В результате расщепления бактериальных клеток внутри фагоцита расходуется фермент лизоцим (мурамидаза), который вызывает гидролиз гликопротеидов плазмалеммы. Гранулоциты содержат уникальную субстанцию - фагоцитин, обладающая антибактериальным действием и способная уничтожить грамотрицательную и грамположительную микрофлору. Иные механизмы, приводящие к гибели фагоцитируемого объекта, включают действие катионных белков, меняющих поверхностные свойства мембраны; влияние лактоферрина, конкурирующего за ионы железа; действие различных амилолитических, протеолитических и липолитических ферментов, содержащихся в гранулах фагоцитов и разрушающих мембрану бактерий и вирусов.

Система комплемента. Данная совокупность важных энзимов - ферментная система, состоящая более чем из 20 белков, играющая важную роль в осуществлении защитных реакций, течении воспаления и разрушения (лизиса) мембран бактерий и различных клеток.

Параллельно с активацией системы комплемента усиливается разрушение чужеродных и старых клеток, активируются фагоцитоз и течение иммунных реакций, повышается проницаемость сосудистой стенки, ускоряется свертывание крови, что в конечном итоге приводит к более быстрой ликвидации патологического процесса.



Экспериментально показано, что чужеродные для данного организма соединения, способные вызывать иммунный ответ, получили наименование «антигены» (АГ). Гипотетически любая молекула может быть АГ. Как результат действия АГ в организме образуются антитела (АТ), сенсibiliзируются (активируются) лимфоциты, благодаря чему они приобретают способность принимать участие в иммунном ответе. Индивидуальность действия АГ заключается в том, что он избирательно реагирует с определенными АТ или лимфоцитами, появляющимися после попадания АГ в организм.

Химически обусловленная способность АГ вызывать специфический иммунный ответ вызвана наличием на его молекуле многочисленных детерминант (эпитопов), к которым специфически, как ключ к замку, подходят активные центры (антидетерминанты) образующихся АТ. АГ, взаимодействуя со своими АТ, образуют иммунные комплексы (ИК). Важно, что, АГ - это всегда молекулы с высокой молекулярной массой; существуют потенциально активные в иммунологическом отношении вещества, величина молекулы которых соответствует одной отдельной антигенной детерминанте. Такие химические соединения носят наименование гаптенов. Они способны вызывать иммунный ответ, только соединяясь с полным АГ, т. е. белком.

Различают клеточный и гуморальный иммунитет. Клеточный иммунитет направлен на уничтожение чужеродных клеток и тканей и обусловлен действием Т-киллеров. Типичным примером клеточного иммунитета является реакция отторжения чужеродных органов и тканей, в частности кожи, пересаженной от человека человеку. Гуморальный иммунитет обеспечивается образованием АТ и обусловлен в основном функцией В-лимфоцитов.

При формировании иммунного ответа принимают участие иммунокомпетентные клетки, которые могут быть разделены на антигенпрезентирующие (представляющие АГ), регуляторные

(регулирующие течение иммунных реакций) и эффекторы иммунного ответа (осуществляющие заключительный этап в борьбе с АГ).

Клетками, обладающими антигенпрезентирующими свойствами относятся моноциты и макрофаги, эндотелиальные клетки, пигментные клетки кожи (клетки Лангерганса) и др. К клеткам, участвующим в процессах регуляции относятся Т- и В-хелперы, супрессоры, контрсупрессоры, Т-лимфоциты памяти. Экспериментально показано, что к эффекторам иммунного ответа принадлежат Т- и В-киллеры и В-лимфоциты, являющиеся в основном антителопродуцентами.

Определяющая роль в иммунном ответе отводится особым цитокинам, получившим наименование интерлейкинов (ИЛ). Из названия видно, что ИЛ обеспечивает взаимосвязь отдельных видов лейкоцитов в иммунном ответе. Эти соединения представляют собой малые белковые молекулы с молекулярной массой 15 000 - 30 000 [33].

#### **1.4. Микрофлора внутренней среды организма**

Жизненноважные системы человеческого организма, открытые для контакта с внешней средой, обсеменяются микроорганизмами. Недоступными для контакта с микрофлорой окружающей среды являются кровь, спинномозговая жидкость (ликвор), суставная жидкость, плевральная жидкость, лимфа грудного протока и ткани внутренних органов. Кровь и внутренние органы здорового человека стерильны.

С возникновением различных заболеваний в кровь могут проникать микроорганизмы. Вместе с этим при изменениях физико-химического состава внутренней среды организма (буферность, кислотность, солевой состав, содержание органических веществ) снижается иммунная функция, и создаются благоприятные условия для развития микроорганизмов. Исследования показали, что микробиологические показатели крови здоровых людей, людей с различными заболеваниями, а также исследований микрофлоры трупной крови в первые часы после смерти характеризуются

своими значениями. Выявлен ряд микроорганизмов, наиболее часто встречающихся в посевах крови. К ним относятся грамотрицательные бактерии, грамположительные бактерии, анаэробные и факультативно анаэробные грибы (Таблица 1.). [27,35.],

Таблица 1.

Микроорганизмы, обнаруженные в крови при различных заболеваниях

<b>Грамотрицательные бактерии</b>	<b>Грамположительные бактерии</b>	<b>Грибы</b>
<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Candida</i>
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Staphylococcus sp.</i> ,	<i>Mucor sp.</i> ,
<i>Proteus sp.</i>	<i>Streptococcus sp.</i>	<i>Fusarium sp</i>
<i>Acinetobacter sp.</i>	<i>Enterococcus sp.</i>	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Enterococcus gallinarum</i>	
<i>Propionibacterium spp.</i>	<i>Enterococcus faecium</i>	

Показано, что среди интегральных показателей иммунобиологической защиты наиболее адекватным параметром является фагоцитарная активность нейтрофилов крови. Системой фагоцитоза фиксируются многочисленные изменения внутренней среды организма. Наиболее показательны в этом отношении нейтрофилы [3]. О функциональном состоянии системы антимикробной резистентности организма, реагирующей на любые изменения гомеостаза позволяют судить результаты исследования биохимического, клеточного и микробиологического состава крови.

Многочисленные клинические наблюдения позволили установить, что инфекции грибково-бактериальной природы являются одним из наиболее часто встречающихся осложнений после иммуносупрессивной полихимиотерапии у онкогематологических больных на фоне нейтропении [22]. Данные исследования не являются пионерскими, в конце 20 века был отмечен заметный рост числа грибковых инфекций, особенно у иммунокомпрометированных больных, к числу которых относятся и онкологические больные. В такой группе риска являются в первую очередь

больные после проведения цитостатической терапии с острыми лейкозами, а также больные с осложнениями после хирургических вмешательств на брюшной полости и находящиеся в отделениях интенсивной терапии, получающие длительную и массивную антибактериальную терапию. [24,43.]

Вместе с получающей в последнее время все более широкомасштабными антибиотикотерапией и угнетением иммунитета в результате агрессивной цитостатической терапии риску грибковой суперинфекции способствуют лечение кортикостероидами, наличие хронических заболеваний, более пожилой возраст больных [15]. По результатам исследований в биологических образцах, полученных от больных преобладают дрожжеподобные грибы рода *Candida*. Значительно реже встречаются другие аспергиллы, *Mucor*, *Fusarium spp.*, другие плесневые грибы. В условиях снижения иммунитета у больных, относящихся к группам риска, наблюдается появление грибковой суперинфекции [18].

Заслуженный интерес вызывают полученные экспериментальные данные лаборатории микробиологической диагностики и лечения инфекций в онкологии РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, обсемененность патологических материалов (количество штаммов *Candida spp.* к количеству материалов, в которых был получен рост микроорганизмов) составила 22,4%. Значения частот выделения *Candida spp.* (количество штаммов *Candida spp.* к количеству больных, от которых они были получены) составляла 25,6%. [42].

Анализ литературных данных показал, что основным успехом в изучении бактериемий, развивающихся на фоне других заболеваний, явилось исследование мазков крови одних и тех же людей через небольшой промежуток времени, но в течение продолжительного времени, а также сопоставление отличий крови здоровых людей и людей больных раком. Мною были также обнаружены особенности состава крови у людей с другими заболеваниями и изменения состава крови человека в зависимости от его возраста. В рамках нашей темы мы рассмотрим микромир организмов, сопутствующих раковому заболеванию. Кровь онкологических больных

предоставлялась Онкологическим центром. В то время там лечились некоторые наши коллеги. Работа была завершена только после получения устойчивой повторяемости результатов. Появление новой информации при просмотре мазков периферической крови не вносило существенного изменения в уже известный материал. Она лишь дополняла информацию новыми интересными фактами.

Имеются достоверные данные длительного исследования по выявлению эволюционно-закрепленной микрофлоры и микрофауны в крови человека. В начале исследования даже не предполагалось ее существование. Наличие в крови микрофлоры и микрофауны «проявилось» в результате многократных просмотров и длительного изучения жизненного цикла шести микроорганизмов с учетом смены времен года.

С целью поиска тех микроорганизмов, которые и должны быть у людей в кровяном русле; разобраться в жизненном цикле каждого микроорганизма, проследить весь путь его развития и найти формы размножения; выделить среди них эволюционно-закрепленную микрофлору (а позже оказалось, что есть и фауна); еще раз убедиться, что все повторяется, и повторяется без изменений, исследователям и потребовалось несколько лет работы. Результаты этого многолетнего труда заинтересовали современных клиницистов.

Результат комплексных исследований показал, что развитие ракового заболевания сопровождается изменением среды обитания микроорганизмов - плазмы крови. В несколько этапов в плазме крови происходят биохимические реакции, способствующие «включению» отдельных участков генома микроорганизмов. В результате таких процессов происходит биохимический синтез белка микроорганизма, под управлением наследственной информации работающего в данный момент гена. Индивидуально отвечающий за структуру белка участок генома «включается» лишь в том случае, когда в плазме крови создается определенная среда для «включения» этого участка генома у

микроорганизма. Данный механизм геномной экспрессии свидетельствует о том, что под влиянием среды в геноме микроорганизма вырабатываются новые качества жизни и закрепляется соответствующая информация. Естественно, для выработки таких механизмов могли потребоваться миллионы лет, но «включаться» в жизненном цикле микроорганизма этот участок генома будет только тогда, когда для этого будет создана необходимая среда. Как альтернатива данному механизму этот участок генома «отключен». Взаимодействие генной регуляции этих исключаящих друг друга механизмов привело к наследственному закреплению способности к синтезу определенного белка. Но для закрепления микроорганизму требуется длительное время, возможно, миллионы лет, но уж если появилась среда для синтеза, то под управлением гена синтез белка непременно будет осуществлен [23].

Онкология – всегда сильнейший стресс для человеческого организма. Полный период развития ракового заболевания сопровождается изменением содержания кислорода в плазме крови в сторону его постепенного уменьшения. Такое логическое заключение сделано исходя из следующих наблюдений: во-первых, в плазме крови при нарастании заболевания количество микроорганизмов быстро нарастает, во-вторых, часть из них при размножении использует эритроциты, в третьих - продукты жизнедеятельности микроорганизмов нарушают состав плазмы, что ухудшает работу эритроцитов по переносу кислорода. Существенное снижение количества кислорода, доставляемого эритроцитами, приводит к преобладанию процессов, близких к анаэробным. При этом размножается анаэробная микрофлора и микрофауна. Экспериментально удалось показать, что отдельные микроорганизмы усложняют свой жизненный цикл при постепенном переходе на питание с пониженным содержанием кислорода в среде, в плазме крови.

## 1.5. Заболевания крови как фактор снижения иммунитета

Наследственный иммунитет проявляется у представителей всех биологических видов без исключения. Более чем у 90 % биологических видов (бактерии, грибы, растения, одноклеточные животные) антимикробная защита обеспечивается исключительно наследственными свойствами. У беспозвоночных многоклеточных животных действует, кроме того, система фагоцитоза, которая уничтожает внедрившихся аггессоров путем их поглощения специальными клетками - фагоцитами. Только у позвоночных - животных и человека, количество которых составляет менее одного процента населяющих Землю биологических видов, наследственные и фагоцитарные механизмы дополняются факторами индивидуально приобретаемого иммунитета, которые создаются лимфоидной системой [13].

Лимфоидная система иммунитета вступает в действие лишь в том случае, когда механизмы наследственного иммунитета не смогли воспрепятствовать началу инфекционного процесса [26].

Среди заболеваний крови особое место занимают онкологические заболевания, к которым относят различные типы лейкозов. В зависимости от клеточного субстрата лейкозов их подразделяют на хронические и острые. К острым лейкозам относят опухоли, представленные бластными клетками. Острый лейкоз - опухолевое заболевание кроветворной системы, при котором субстрат опухоли составляют бластные клетки. Опухолевая трансформация осуществляется на самых ранних этапах дифференцировки стволовой кроветворной клетки, и ее дальнейшее созревание не происходит (рис. 1, 2). Термин «острый лейкоз» отражает не временной фактор (длительность течения болезни), а морфологические и цитохимические особенности опухолевых клеток. Клинические проявления различных форм острого лейкоза достаточно стереотипны и обусловлены выраженным угнетением нормального кроветворения вследствие лейкемической инфильтрации красного костного мозга.

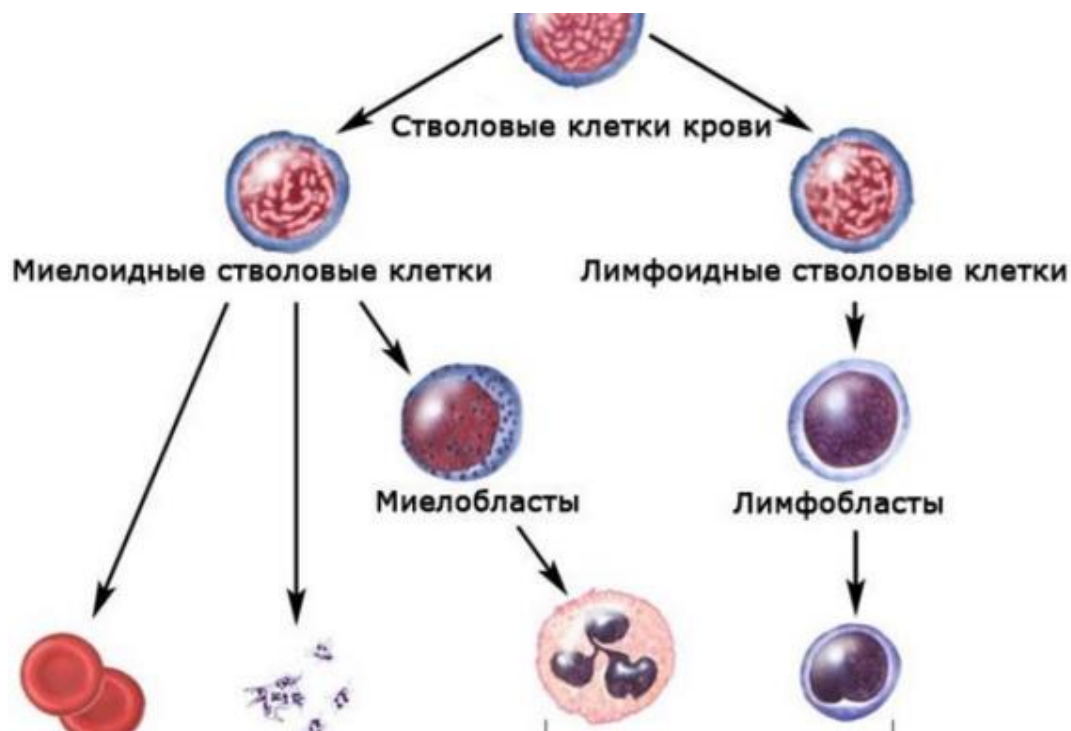
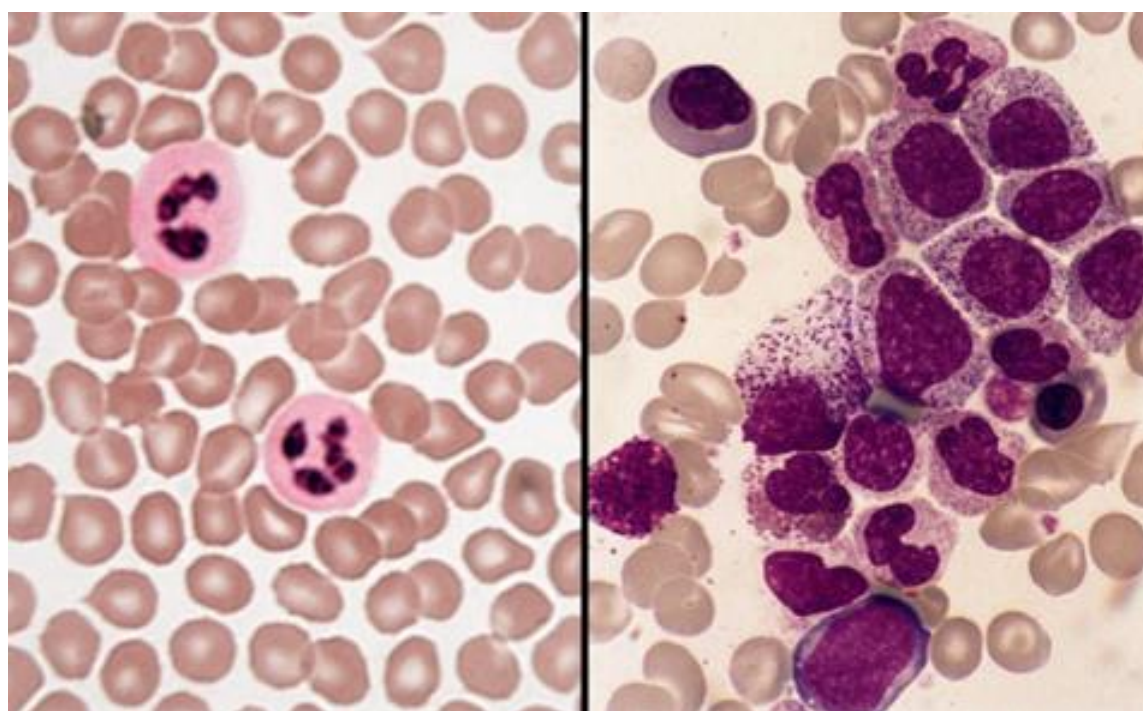


Рисунок 1. Образование клеток крови, незрелые, бластные формы



А

А

Рисунок 2. Микропрепарат крови человека: А – здорового, Б – с избытком бластных клеток

Среди хронических лейкозов выделяют миелопролиферативные и лимфопрлиферативные заболевания. К числу хронических миелопролиферативных процессов относят ХМЛ, эритремию (истинную



полицитемию), идиопатический миелофиброз (сублейкемический миелоз) и эссенциальную тромбоцитемию (хронический мегакариоцитарный лейкоз, геморрагическая тромбоцитемия) [31,39].

Для всей группы миелопролиферативных лейкозов характерна мутация на уровне полипотентной стволовой клетки. В дальнейшем он проецируется на следующий класс стволовых клеток (олигопотентных) - клетки-предшественницы смешанной культуры. Они дают начало трем линиям миелоидного кроветворения - эритроцитарной, гранулоцитарной и мегакариоцитарной. Развивается миелоидная пролиферация - основной признак, характеризующий субстрат этих заболеваний, при этом продукция клеток происходит из одного или нескольких ростков миелоидного кроветворения (эритробластического, гранулоцитарного и мегакариоцитарного). В настоящее время 10-летняя безрецидивная выживаемость при остром лимфобластном лейкозе (ОЛЛ) составляет 75% [37].

Клеточный субстрат хронических лейкозов - зрелые дифференцированные клетки крови. Как и для опухолей других тканей, для гемобластозов характерны законы опухолевой прогрессии: клональность (происхождение из одной клетки) и увеличение количества хромосомных мутаций внутри первоначальной клеточной популяции, приводящее к появлению новых мутантных субклонов, определяющих изменчивость свойств опухоли. [4].



Рисунок 3. Развитие лейкоза

У больных острыми лейкозами на всех стадиях заболевания выявляются нарушения иммунного статуса, характеризующиеся изменением содержания популяций и субпопуляций лимфоцитов крови и концентрации иммуноглобулинов в сыворотке. Наиболее выраженные нарушения иммунного статуса у больных острым нелимфобластным лейкозом установлены на стадиях ремиссии и рецидива заболевания, тогда как у больных острым лимфобластным лейкозом - только при ремиссии заболевания. Независимо от стадии острых лейкозов выявляется снижение содержания в крови NK-клеток, однако их минимальное количество обнаруживается при повторном рецидиве. Восстановление параметров клеточного иммунитета в ремиссии острого лимфобластного лейкоза происходит быстрее, чем при остром нелимфобластном лейкозе. [29] Неблагоприятность исходов больных острым лейкозом во многом обусловлена развитием инфекционных осложнений после проведения химиотерапии [6]. Данный вид нарушений возникает у больных вне

зависимости от вида заболевания, значительно ухудшает качество их жизни, влияет на исход болезни, понижая выживаемость больных после проведенного лечения [5]. Появившаяся патологическая опухолевая клетка начинает оказывать комплексное воздействие на организм больного, формируя ответную его реакцию. Насколько успешен будет иммунный ответ, зависит от особенностей функционирования клеток иммунной системы, от их внутреннего метаболизма [22].

## **Глава 2**

### **2.1. Материалы исследования**

Материалом для данного исследования послужили образцы крови здоровых людей и людей, страдающих хроническим лимфобластным лейкозом и острым миелобластным лейкозом (поли), полученные из клинической больницы города Белгорода. Забор крови проводился сотрудниками больницы, образцы доставлялись в НИУ «БелГУ» для микробиологического анализа с соблюдением правил транспортировки подобного материала.

В каждой группе выборка составила 10 человек. Посев образцов производили в трехкратной повторности.

### **2.2. Методы исследования.**

Для выявления обсемененности крови микроорганизмами нами был использован метод прямого посева на питательные среды «газоном».

Для выявления общей обсемененности использовали универсальную питательную среду Мясо-пептонный агар (МПА) [8]. Данная питательная среда с добавлением определенных компонентов (крови, сыворотки, яичного желтка и т. п.) употребляется для культивирования некоторых патогенных микроорганизмов, плохо растущих или совсем не растущих на обычных питательных средах [20].

Для выявления и идентификации энтеробактерий использовали селективную питательную среду Агар с эозином и метиленовым голубым (Агар Левина), который используется для дифференциации *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes*, быстрой идентификации грибов *Candida albicans*. Метиленовый синий и эозин в определенной степени подавляют рост грамположительных микроорганизмов. Данные красители служат дифференцирующими индикаторами фермента лактозы. На этой среде могут

вырастать в виде точечных колоний дрожжи и некоторые грампозитивные бактерии [17].

Для обнаружения дрожжей и плесневых грибов использовали среду Чапека. Данная среда является полусинтетической средой с нитратом натрия в качестве единственного источника азота. Это одна из наиболее широко распространенных сред общего назначения для культивирования грибов. Ее можно использовать также для определения хламидоспор у грибов *Candida albicans*. Благодаря присутствию солей, она хорошо забуферена, рН имеет слабощелочное значение. На этом агаре обильно растут почти все сапрофитные аспергиллы, образуя характерный мицелий и конидии

Питательные среды готовили и предварительно стерилизовали согласно инструкции. Далее охлаждённую до 40°C питательную среду наливали в чашки Петри в количестве 4 мл.

После застывания среды на поверхность при помощи автоматической пипетки наносили исследуемые образцы крови, распределяли равномерно по поверхности при помощи шпателя Дригальского и культивировали в термостате при температуре 37°C (Рис. 4.).

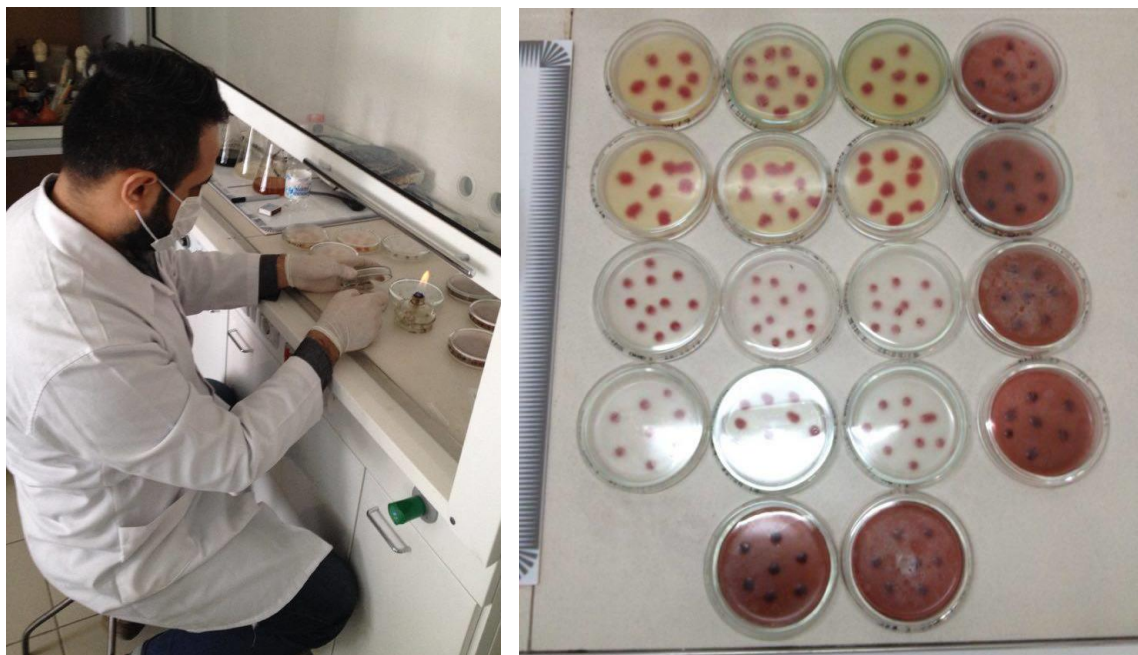
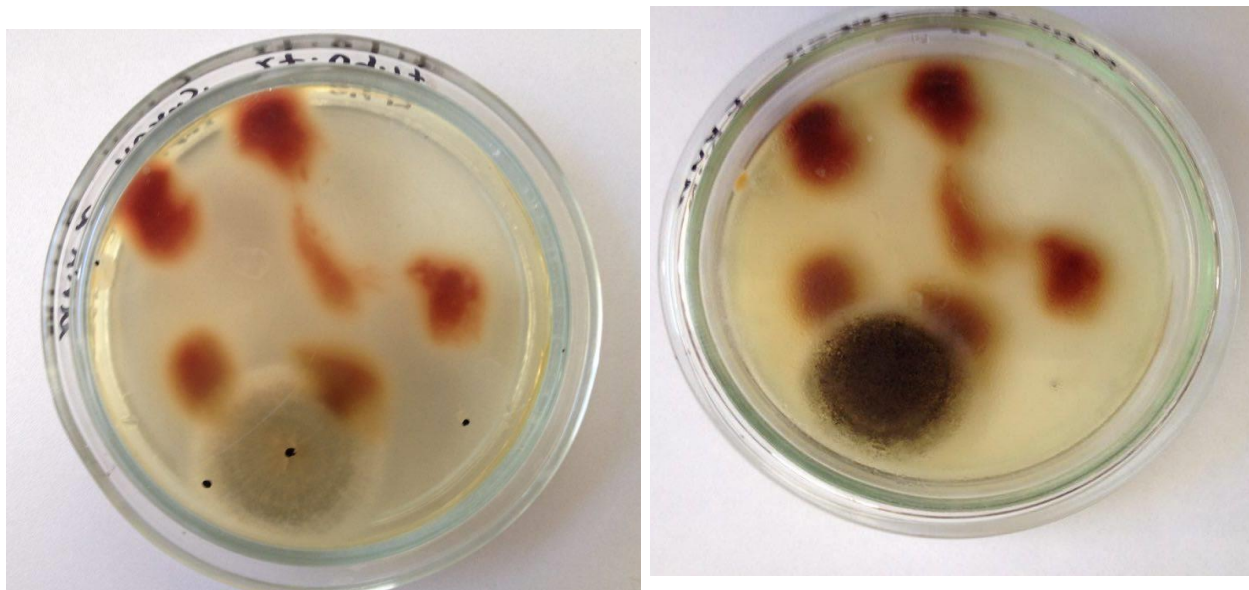


Рисунок 4. Посев исследуемых образцов на плотные питательные среды

Контроль роста микроорганизмов осуществляли ежедневно (рис. 5).



А

Б

Рисунок 5. Рост *Aspergillus niger* на среде Чапека.

А – на 6 день культивирования, Б – на 9 день культивирования (Видно активное спорообразование)

Далее для идентификации микроорганизмов использовали метод приготовления фиксированных микропрепаратов и окраски по Граму для бактерий и препаратов методом раздавленной капли – для грибов.

Для приготовления фиксированных препаратов на чистое предметное стекло наносили мазок исследуемой колонии микроорганизма, высушивали и фиксировали в пламени спиртовки. Затем препарат окрашивали раствором метиленового синего или фуксина в течение 20-25 секунд, промывали, высушивали и рассматривали под микроскопом с иммерсией. Для окраски по Граму использовали стандартную методику.

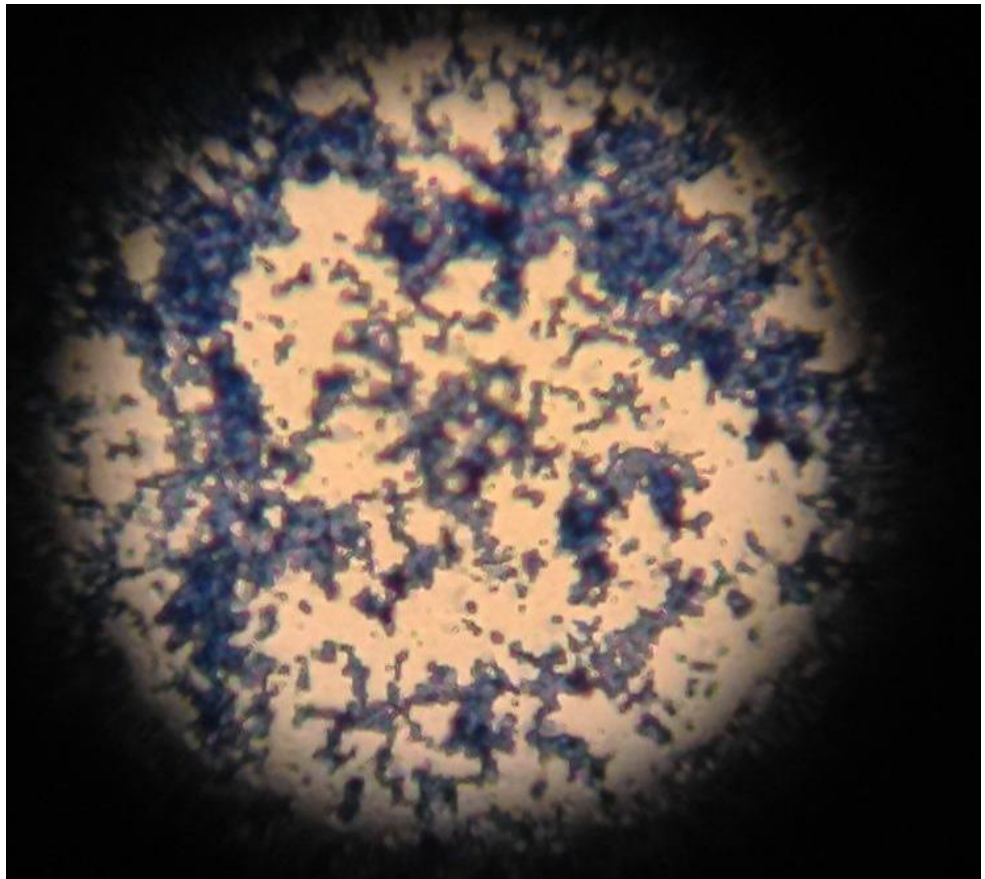


Рисунок 6. Фиксированный препарат *Staphylococcus aureus*(Увеличение x400)

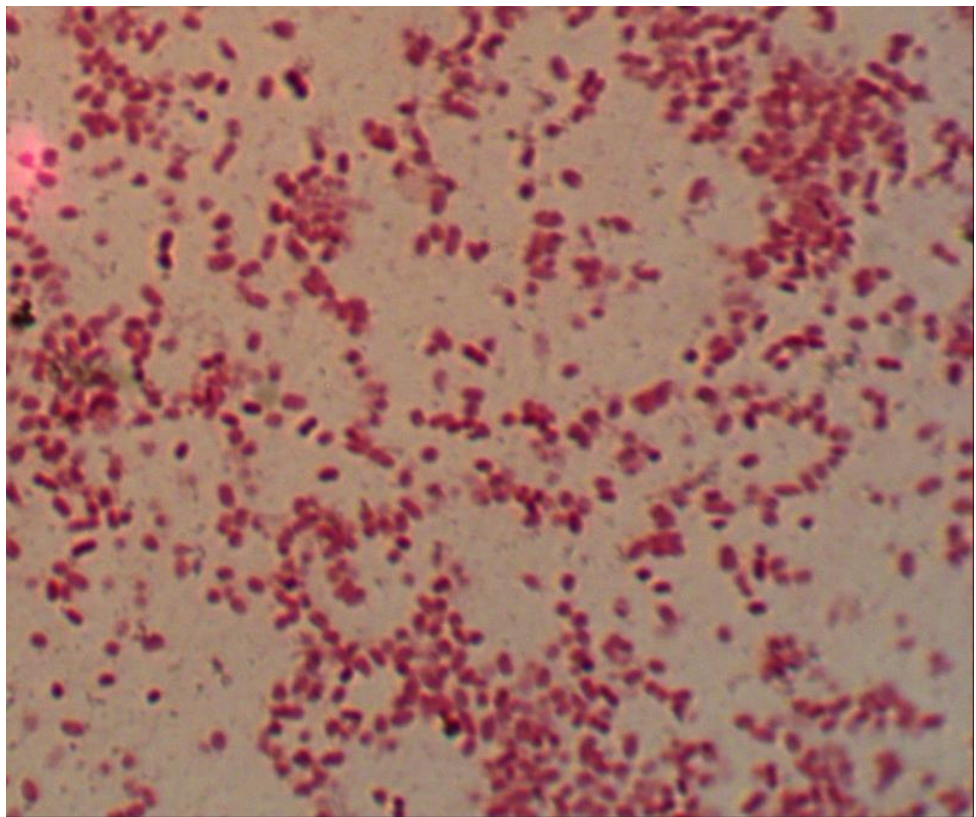


Рисунок 7. Фиксированный препарат *Enterococcus sp.*(Увеличение x400)

После



Рисунок 8. Препарат *Aspergillus niger* (Увеличение x100)

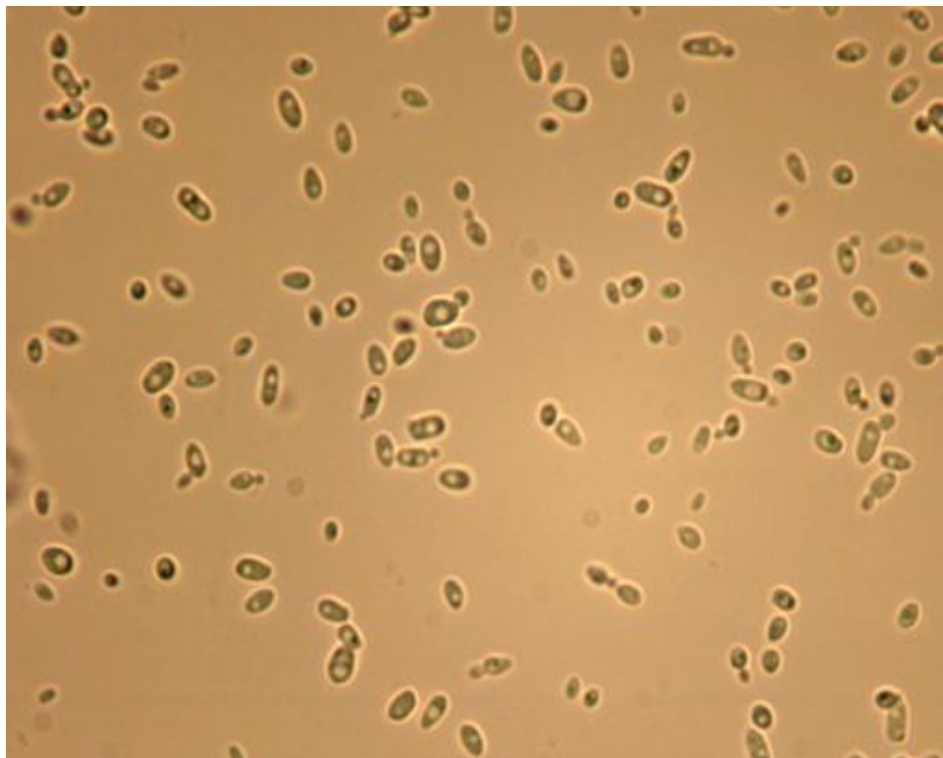


Рисунок 9. Препарат *Candida spp.* (Увеличение x400)

После определения группы микроорганизма по отношению к окраске по Граму проводили точное определение микроорганизмов при помощи



автоматического анализатора микроорганизмов Autoscan 4. Данный прибор позволяет проводить идентификацию микроорганизмов и определение их чувствительности к антибактериальным препаратам за 24 часа. Идентификация грибов, гемофилов, нессерий и анаэробов проводится за 4 часа. Тестируемый спектр включает в себя более 300 микроорганизмов.

При помощи Autoscan 4 можно проводить анализ микроорганизмов с использованием стандартных панелей по определению культуральных биохимических характеристик и по чувствительности микроорганизмов к широкому спектру используемых в России антибиотиков отечественного и зарубежного производства, включая антибиотики последнего поколения [2].

Нами были использованы три типа панелей: MicroScan Dried Negative Breakpoint Combo (NBC41) для грамотрицательных микроорганизмов, MicroScan Dried Gram Positive ID Type 29 (PC29) для грамположительных микроорганизмов и MicroScan RY-D для грибов. Тесты антибактериальной чувствительности являются миниатюризацией теста чувствительности дегидратированного бульонного раствора. Различные бактерицидные добавки разбавлены в питательной среде Мюллер-Хинтона с добавлением кальция и магния или иных дополнительных веществ до концентрации, представляющей клинический интерес.

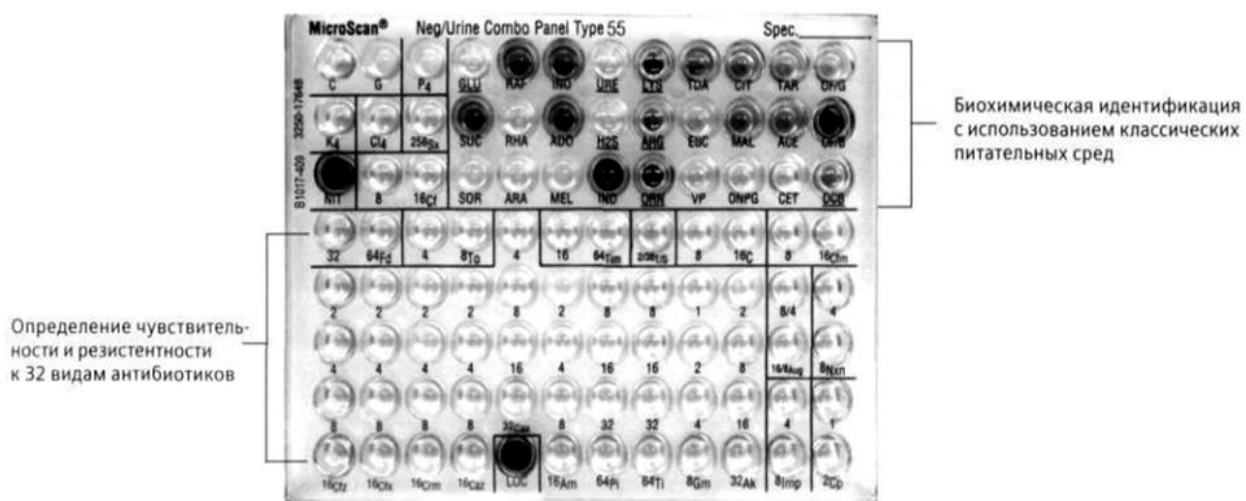


Рисунок 10. Стандартная панель MicroScan

После получения суточной культуры исследуемого микроорганизма проводили подготовку стандартной панели, которая включает в себя:

1. Подготовку материала к посеву по методике стандартной мутности.

Используя стерильную бактериологическую петлю, касались поверхности 4-5 больших или 5-10 малых морфологически подобных, хорошо изолированных колоний микроорганизмов на агаризованной питательной среде, переносили содержимое петли в пузырек с водой для посева. Плотнo закрывали крышку, размешивайте полученную суспензию 2-3 секунды. Далее помещали пузырек с полученной суспензией в ячейку MicroScan Turbidity Meter, показания которого должны быть в диапазоне 0,06 – 0,10. После этого добавляли пипеткой 0.1 мл (100 мкл) стандартизированной суспензии в пузырек с водой для посева с PLURONIC. Плотнo закрывали крышку, размешивайте полученную суспензию, переворачивая пробирку 8-10 раз.

2. Регидратацию и засев панели выполняли при помощи системы RENOK и D-инокуляторов B1013-4 (Рис. 11).

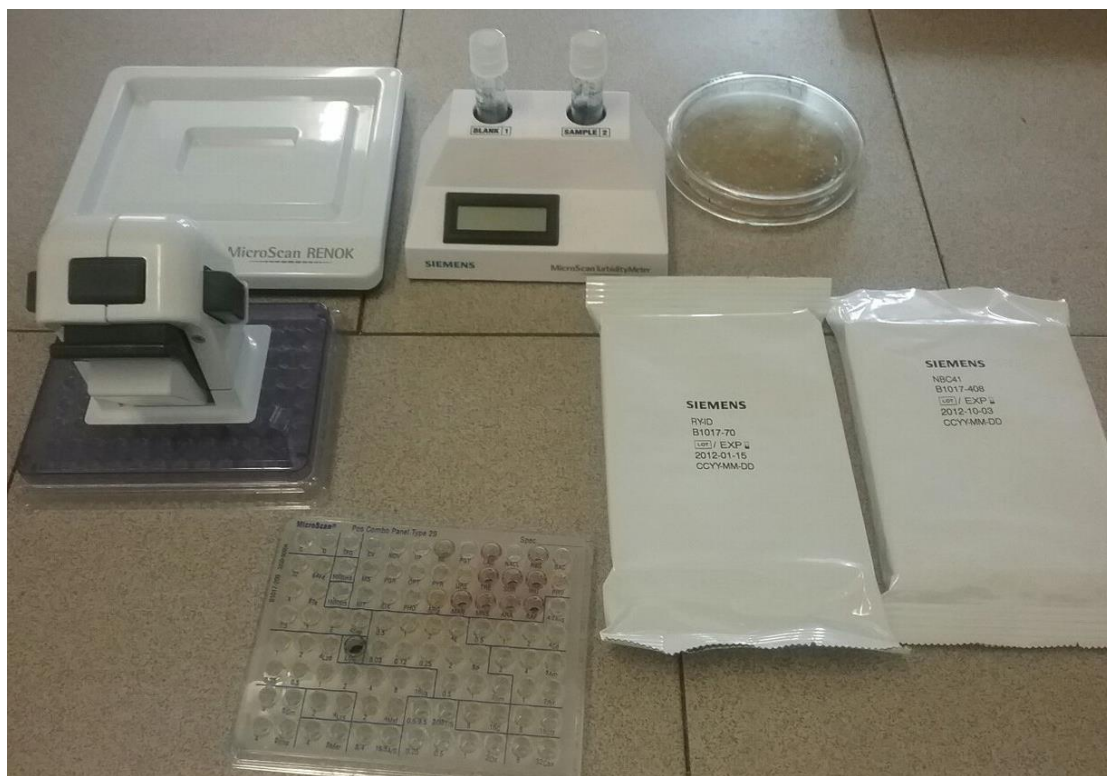


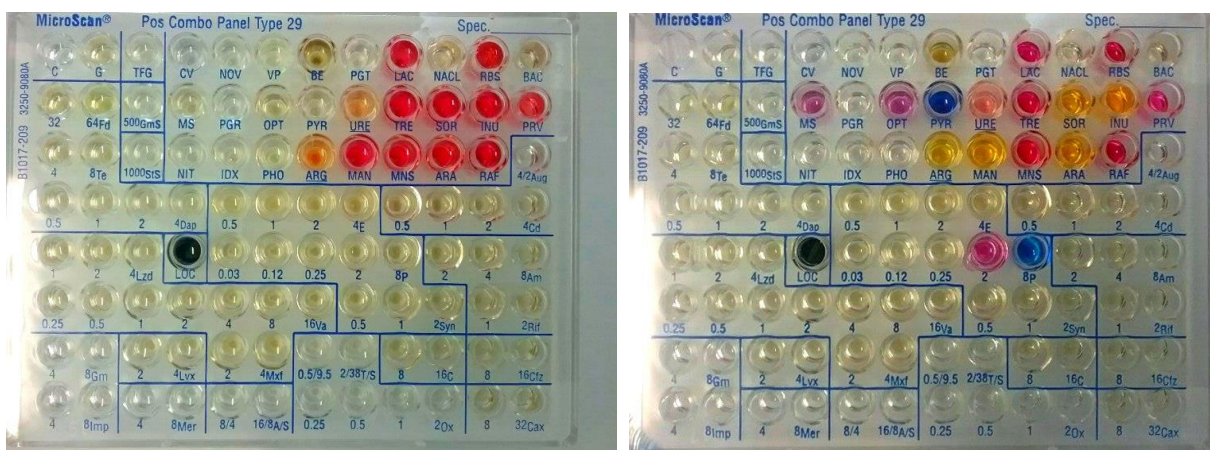
Рисунок 11. Система подготовки и засева панели для определения микроорганизмов

Для тестирования анаэробноза использовали биохимические слои (закапывание масла) для грамположительных бактерий в лунки три капли минерального масла на наносили на поверхность ячеек ARG и URE, для грамотрицательных – в лунки GLU, URE, H2S, LYS, ARG, ORN и DCB.

Инкубацию проводили течение минимум 16-20 часов при температуре 35°C в термостате (без углекислого газа).

После 16-20 часов инкубации панели доставали из термостата и добавляли реагенты в соответствующие ячейки согласно методике. По истечению 20 минут и прохождении биохимических реакций можно было определить положительные качественные реакции в соответствующих ячейках визуально (рис. 12).

3. Считывание результатов на анализаторе AutoScan-4. и сопоставление с данными реестра патогенных микроорганизмов, имеющимся в базе данных прибора.



А

Б

Рисунок 12. Панель PC29 для грамположительных микроорганизмов

А – сразу после засева, Б – перед считыванием на AutoScan-4

### Глава 3. Результаты и обсуждение

По результатам проведенных исследований в крови здоровых людей в девяти пробах из десяти достоверно не выявлено присутствие микроорганизмов. В одном из образцов были выявлены единичные колонии *Staphylococcus aureus*.

В пробах крови людей, страдающих хроническим лимфобластным лейкозом на седьмой день культивирования на питательных средах был обнаружен *Staphylococcus aureus* (рис. 6) в двух пробах из десяти.

В пробах крови, полученной от людей, страдающих острым миелобластным лейкозом (поли) на второй день культивирования на питательной среде Левина для идентификации энтеробактерий в одной пробе из десяти были выявлены микроорганизмы рода *Enterococcus sp.* (рис. 7) и *Candida*.

На шестой день культивирования на среде Чапека для дрожжей и мицелиальных грибов в одном образце был обнаружен *Aspergillus niger* (рис. 5,8), который далее, начиная с седьмого дня был выявлен еще в одном из исследуемых образцов крови.

На седьмой день в трех пробах, полученных от людей страдающих данным заболеванием, также на универсальной среде МПА был обнаружен *Staphylococcus aureus*, на девятый день культивирования на питательной среде Чапека в двух образцах были обнаружены колонии грибов рода *Candida* (рис. 9).

Полученные результаты сопоставимы с данными, описанными в изученных ими литературных источниках. Микроорганизмы, выявленные в посевах крови исследуемых групп людей довольно часто встречаются при заболеваниях системы крови и служат показателем снижения иммунитета, вызываемого самим заболеванием или сопутствующим лечению данных заболеваний.

Результаты лабораторного исследования образцов крови представлены в таблице 2 и таблице 1 Приложения

Таблица 2.

Случаи обнаружения микроорганизмов в образцах крови.

Микроорганизм	Случаи обнаружения		
	Кровь здоровых людей	Хронический лимфобластный лейкоз	Острый миелобластный лейкоз (поли)
<i>Staphylococcus aureus</i>	1	2	3
<i>Enterococcus sp.</i>	-	-	1
<i>Candida sp</i>	-	-	2
<i>Aspergillus niger</i>	-	-	2

## Заключение.

В ходе проведенного исследования нами была изучена литература по проблеме человеческого иммунитета и его изменению вследствие заболеваний системы крови, был проведен анализ микрофлоры крови трех групп людей: здоровых, страдающих хроническим лимфобластным лейкозом и страдающих острым миелобластным лейкозом (поли) с точки зрения показателя иммунитета. Выборка составила 10 образцов в каждой группе.

Нами был проведен микробиологический анализ крови в каждой из указанных групп. В крови здоровых людей достоверно не выявлено бактерий и грибов, в крови больных хроническим лимфобластным лейкозом были обнаружены в некоторых случаях микроорганизмы *Staphylococcus aureus*. В крови больных острым миелобластным лейкозом (поли) обнаружены бактерии *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus sp* и грибы рода *Candida*, *Aspergillus niger*.

В ходе анализа полученных данных выявлено, что микроорганизмы, обнаруженные нами в посевах крови исследуемых групп людей часто встречаются при заболеваниях системы крови, особенно при нарушениях функций лимфоцитарной системы. Исходя из полученных нами результатов исследования и анализа литературных данных, можно говорить о том, что данные микроорганизмы наиболее характерны при бактериальном и грибном заселении крови на фоне рассматриваемых заболеваний.

Согласно литературным данным, внутренняя среда организма стерильна, но при снижении функций защитных иммунных механизмов на фоне системных заболеваний, химиотерапии, лечения антибиотиками, кортикостероидами другими препаратами микроорганизмы, обитающие на коже, в полостях человеческого тела и заносимые из внешней среды и проникающие во внутреннюю среду не встречают преграды в виде естественного иммунитета и получают возможность развиваться. Результаты проведенного исследования показывают, что у здоровых людей без серьезного нарушения иммунитета в крови не присутствуют микроорганизмы, у людей с хроническим лимфобластным лейкозом, которые

обычно получают щадящие виды лечения, встречаемость и количество различных микроорганизмов в периферической крови ниже, чем у людей с острым миелобластным лейкозом. Данный факт свидетельствует о том, что косвенно обнаружение микроорганизмов во внутренней среде может указывать на пониженный уровень человеческого иммунитета.

В свою очередь, данные микроорганизмы продуктами метаболизма изменяют химический состав крови, образуют скопления во внутренних органах, капиллярах и лимфатических сосудах. И изменением состава внутренней среды также может влиять на ее защитные функции.

По результатам проведенного исследования представляется возможным сделать следующие выводы:

1. В крови больных хроническим лимфобластным лейкозом и острым миелобластным лейкозом обнаружены такие микроорганизмы как бактерии *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus* sp и грибы рода *Candida*, *Aspergillus niger*.

2. Данные виды микроорганизмов наиболее характерны при бактериальном и грибном заселении крови на фоне рассматриваемых заболеваний.

3. При снижении иммунитета в результате онкологических заболеваний крови, химиотерапии, лечения антибиотиками, и другими препаратами встречаемость и количество различных микроорганизмов в периферической крови повышается

4. Обнаружение микроорганизмов во внутренней среде может указывать на пониженный уровень человеческого иммунитета.

5. Такие микроорганизмы как *Aspergillus niger*, *Staphylococcus aureus* и другие продуктами метаболизма изменяют химический состав крови, образуют скопления во внутренних органах, капиллярах и лимфатических сосудах. И изменением состава внутренней среды также может влиять на иммунные свойства крови.

## Список использованной литературы

1. / М. М. Безруких: лаборант. практикум / И.В. Батлуцкая, Е.В. Маслова, К.А, В.Д.Сонькин, Д.А. Фарбер. - М.: Издательский центр «Академия», 2003. - 416 с.
2. Биотехнология Безруких М.М. и др. Возрастная физиология: (Физиология развития ребенка): Учеб. пособие для студ. высш. пед. учеб. заведений. Дегтярёва, В.В. Ключева. – Белгород: ИД «Белгород» НИУ «БелГУ», 2017. – 72с.
3. Волкова М.А. Клиническая онкогематология. -М.: Медицина, 2001. - С.156-214
4. Воробьев А.И. Руководство по гематологии в 3-х томах.– М.: Ньюдиамед, 2002. – Т. 1. – 280 с.. Савченко В.Г., Паровичникова Е.Н., Исаев В.Г. Программное лечение лейкозов. – М., 2002. – 331 с.
5. Галстян Г.М., Кесельман С.А., Городец- кий В.М., Алексанян М.Ж., Куликов С.М., Гем- джян Э.Г., Паровичникова Е.Н., Савченко В.Г., Воробьев А.И. Сочетанное проведение химиоте- рапии гемобластозов и терапии острой дыхатель- ной недостаточности в реанимационных услови- ях // Терапевтический архив. – 2009. – № 12. – С. 37-43
6. Гистология, эмбриология, цитология : учебник / Ю. И. Афанасьев, Н. А. Юрина, Е. Ф. Котовский и др.. - 6-е изд., перераб. и доп. - 2012. - 800 с.
7. ГОСТ 20730-75 Питательные среды. Бульон мясо-пептонный (для ветеринарных целей). Технические условия.
8. Грувер К. П. Клинико-эпидемиологическое значение бактериемии: автореф. дис. канд. мед. наук. - М., 2011. - 26 с.
9. Грувер К.П., Белобородов В.Б. Клиническое значение бактериемии у больных сепсисом // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. - 2011. - Т. 13, № 1. - С. 90–97.
10. Грувер К.П., Жуховицкий В.Г., Белобородов В.Б. Клинико-эпидемиологические особенности бактериемии // Инфекционные болезни. - 2010. - Т. 8, № 4. - С. 13–18.



11. Дмитриева Н.В., Петухова И.Н., Иванова Л.Ф. и др. Грибковые инфекции у больных солидными опухолями и гемобластозами. – Инфекции и антимикробная химиотерапия, 2001, т.3., N3, с.92–93.
12. Земсков А.М., Земсков В.М. Дополнительные методы оценки иммунного статуса//Клин. лаб. диагностика. -1994. -№ 3. -С.34-35.
13. Иванова, Л. Ф. Диагностика и лечение инфекционных осложнений при фебрильных нейтропениях у детей, больных острыми лейкозами / Иванова Л. Ф., Дмитриева Н. В., Дурнов Л. А. // Современная онкология. - 2001. - № 3. - С. 106-108.
14. Иммунная система и иммунокорректоры Куркин В.А., Акимова Н.Л., Авдеева Е.В., Ежков В.Н., Петрухина И.К. Учебное пособие для студентов фармацевтических вузов (факультетов). Самара, 2010. С. 16.
15. Инструкция по применению медицинского изделия для диагностики *in vitro*. Селективная дифференциально-диагностическая плотная питательная среда для выделения энтеробактерий, готовая к использованию, Агар Левина (Агар с эозином и метиленовым синим)
16. Инфекции в онкологии / под ред. М.И. Давыдова, Н.В. Дмитриевой. - М.: Практическая медицина, 2009. - 472 с.
17. Киричук В.Ф. Физиология крови. изд-во СГМУ, 2005
18. Козлов Ю. А. Питательные среды в медицинской микробиологии, с. 62, М., 1950: Руководство по микробиологической диагностике инфекционных болезней, под ред. К. И. Матвеева, М., 1973
19. Манчук В.Т. , Смирнова О.В. Особенности прогнозирования возникновения инфекционных осложнений после проведения химиотерапии у больных острыми лейкозами//Медицинская иммунология. -2012. -Т. 14, № 4-5. -С. 403-408.
20. Никифорова З.Н., Шевченко В.Е., Дмитриева Н.В., Арноцкая Н.Е., Станьчик Т. Изменение кислородзависимой антикандидозной и антимикробной активности нейтрофилов онкогематологических больных со смешанной грибково-бактериальной инфекцией при терапии

с использованием РЧГ-КСФ // Современная онкология. 2003. Т. 5. № 2. С. 71-73.

21. Парахонский А.П. Оценка иммунного статуса при проведении эколого-гигиенического мониторинга населения Успехи современного естествознания. 2006. № 4. С. 65.
22. Петленко В.П.. Основы валеологии. Книга первая. 1998.- 433 с.
23. Румянцев А.Г. Эпидемиология болезней крови у детей по данным исследований, проведенных в федеральном центре детской гематологии, онкологии и иммунологии Росздрава // Вопросы гематологии, онкологии и иммунопатологии в педиатрии. – 2007. – Т. 6, № 3. – С. 27-33.
24. Смирнова О.В., Савченко А.А., Манчук В.Т., Особенности клеточного и гуморального иммунитета у больных острыми нелимфобластным и лимфобластным лейкозами // Сибирский медицинский журнал (Иркутск). 2006. Т. 59. № 1. С. 35-38.
25. Смирнова О.В., Савченко А.А., Манчук В.Т., Особенности клеточного и гуморального иммунитета у больных острыми нелимфобластным и лимфобластным лейкозами // Сибирский медицинский журнал (Иркутск). 2006. Т. 59. № 1. С. 35-38.
26. Тимаков В. Д., Гольдфарб Д. М. Основы экспериментальной медицинской бактериологии, с. 180, М., 1958.
27. Физиология человека. Учебник для вузов / Под ред. Покровского В.М., Коротько Г.Ф. 2-е изд. - М., 2003. - 656 с.
28. Физиология человека. Учебник для вузов / Под ред. Покровского В.М., Коротько Г.Ф. 2-е изд. - М., 2003. - 656 с.
29. Чёрненькая Т. В., Борисова Л. А., Воробьева Т. Ю., Александрова И. В., Косолапов Д. А. Чувствительность к антибиотикам микроорганизмов, выделенных из крови реанимационных больных многопрофильного стационара скорой помощи // Антибиотики и химиотерапия, 2011, 56; 5 - 6, С. 30-36], [Полухина О.В., Суборова Т.Н., Кузин А.А., Петров А.Н., Осовских В.В., Гранов Д.А., Пилипенко В.В. Спектр возбудителей

бактериемии у пациентов с иммунодефицитными состояниями различного происхождения // Инфекция и иммунитет. 2014. Т. 4. № 1. С. 43-48.

30. Чернов В.М., Тарасова И.С., Алексеева Е. В. Микромир в крови человека: Почему мы боеем раком? - М.: Новый Центр, 2003. - 152 с.
31. Электронный ресурс .Режим доступа: <http://oncology.by>
32. Электронный ресурс. Режим доступа: [https://www.syl.ru/article/194311/new\\_vnutrennyaya-sreda-organizma-cheloveka](https://www.syl.ru/article/194311/new_vnutrennyaya-sreda-organizma-cheloveka)
33. Biazar, E. Use of umbilical cord and cord blood-derived stem cells for tissue repair and regeneration/E. Biazar//Expert Opinion on Biological Therapy. - 2014. -Vol. 1. -P. 1-10.]
34. Johanson CE, Duncan JA 3rd, Klinge PM, Brinker T, Stopa EG, Silverberg GD. Multiplicity of cerebrospinal fluid functions: New challenges in health and disease. *Cerebrospinal Fluid Res.* 2008 May 14;5:10.
35. Kremery S. Fungal urinary tract infections in patients at risk. – *Int J Antimicrob Agents*, 1999; 11 (3–4): 289–91.
36. Pelz R.K. Lipsett P.A., Swoboda S. et al. Candida Infections: Outcome and Attributable ICU Costs in Critically Ill Patients. – *J Intensive Care Med* 2000; 15; 255–261.
37. Poca MA, Sahuquillo J, Topczewski T, Lastra R, Font ML, Corral E. Posture-induced changes in intracranial pressure: a comparative study in patients with and without a cerebrospinal fluid block at the craniovertebral junction. *Neurosurgery* 2006; 58:899-906.
38. Silverberg GD, Heit G, Huhn S, Jaffe RA, Chang SD, Bronte-Stewart H, Rubenstein E, Possin K, Saul TA. The cerebrospinal fluid production rate is reduced in dementia of the Alzheimer's type. *Neurology.* 2001 Nov 27;57(10):1763-6.

## Приложения

### Приложение 1.

Микрофлора крови здоровых людей и людей, страдающих хроническим лимфобластным лейкозом и острым миелопластным лейкозом (поли)

Тип питательной среды	Дата						
	27.04.2017	28.04.2017	2.05.2017	3.05.2017	4.05.2017	5.05.2017	12.05.2017
<b>Кровь здоровых людей</b>							
МПА 1	-	-	-	-	-	-	-
МПА 2	-	-	-	staphylococcus aureus	staphylococcus aureus	staphylococcus aureus	staphylococcus aureus
МПА 3	-	-	-	-	-	-	-
Чапека 1	-	-	-	-	-	-	-
Чапека 2	-	-	-	-	-	-	-
Чапека 3	-	-	-	-	-	-	-
Левина 1	-	-	-	-	-	-	-
Левина 2	-	-	-	-	-	-	-
Левина 3	-	-	-	-	-	-	-
<b>Хронический лимфобластный лейкоз</b>							
МПА 1	-	-	-	staphylococcus aureus	staphylococcus aureus	staphylococcus aureus	staphylococcus aureus
МПА 2	-	-	-	staphylococcus aureus	staphylococcus aureus	staphylococcus aureus	staphylococcus aureus
МПА 3	-	-	-	staphylococcus aureus	staphylococcus aureus	staphylococcus aureus	staphylococcus aureus
Чапека 1	-	-	-	-	-	-	-
Чапека 2	-	-	-	-	-	-	-
Чапека 3	-	-	-	-	-	-	-
Левина 1	-	-	-	-	-	-	-
Левина 2	-	-	-	-	-	-	-
Левина 3	-	-	-	-	-	-	-
<b>Острый миелопластный лейкоз (поли)</b>							
МПА 1	-	-	-	-	-	-	-
МПА 2	-	-	-	staphylococcus aureus + aspergillus niger	staphylococcus aureus + aspergillus niger	staphylococcus aureus + aspergillus niger	staphylococcus aureus + aspergillus niger
МПА 3	-	-	-	staphylococcus aureus	staphylococcus aureus	staphylococcus aureus	staphylococcus aureus
Чапека 1	-	-	-	aspergillus niger	aspergillus niger	aspergillus niger Candida sp	aspergillus niger Candida sp
Чапека 2	-	-	aspergillus niger	aspergillus niger	aspergillus niger Candida sp	aspergillus niger Candida sp	aspergillus niger Candida sp
Чапека 3	-	-	-	-	aspergillus	aspergillus	aspergillus

					niger	niger Candida sp	niger Candida sp
Левина 1	-	Enterococcus sp.	Enterococcus sp.	Enterococcus sp. Candida sp	Enterococcus sp. Candida sp	Enterococcus sp.	Enterococcus sp.
Левина 2	-	Enterococcus sp. Candida sp	Enterococcus sp. Candida sp	Enterococcus sp. Candida sp	Enterococcus sp. Candida sp	Enterococcus sp. Candida sp	Enterococcus sp. Candida sp
Левина 3	-	Candida sp	Enterococcus sp. Candida sp	Enterococcus sp. Candida sp	Enterococcus sp. Candida sp	Enterococcus sp. Candida sp	Enterococcus sp. Candida sp