

- Boletales. J. Yeast & Fungal Res., 2011. – 2(4): 44-52.
9. Denchev C.M. and Bakalova G.G. 2002. Centenary review of the fungal diversity investigations in Bulgaria. Bulgarian Mycological Society & Bulgarian Biodiversity Conservation Programme, Sofia.
10. Denchev C.M. and Assyov B. Checklist of the larger basidiomycetes in Bulgaria. Mycotaxon, 2010. – 111: 279-282.
11. Dimitrova E. and Gyosheva M. Hypogeous ascomycetes in Bulgaria. Phytologia Balcanica, 2008. – 14: 309-314.
12. Dimitrova E. and Gyosheva M. Bulgarian *Pezizales*: diversity, distribution and ecology. Phytologia Balcanica, 2009. – 15: 13-28.
13. Dimitrova, E. and Gyosheva, M. Checklist of Bulgarian *Helotiales*. Phytologia Balcanica, 2010. – 16: 3-21.
14. Droumova-Dimcheva M. and Gyosheva-Bogoeva M. Macromycetes in Bulgaria, 1993. p. 1-34.
15. Guzmán G. and Ovrebo C.L. New observations on sclerotermataceous fungi. Mycologia, 2000. – 92: 174-179.
16. Gyosheva M. and Dimitrova E. New records of larger fungi established in habitats of glacial relict plants in Bulgaria. Phytologia Balcanica, 2011. – 17: 165-167.
17. Gyosheva M., Assyov B. and Stoykov D.Y. Some noteworthy *Agaricales* and *Cantharellales* from Bulgaria. Phytologia Balcanica, 2012. – (18)2: 107-111.
18. Gyosheva M.M., Denchev C.M., Dimitrova E.G., Assyov B., Petrova R.D. and Stoichev G.T. Red List of fungi in Bulgaria. Mycologia Balcanica, 2006. – 3(1): 81-87.
19. Karadelev M., Rusevska K. and Stojkoska K. Distribution and ecology of the Gasteromycete fungi - orders Phallales and Sclerodermatales in the Republic of Macedonia. Proceedings of the III Congress of Ecologists of the Republic of Macedonia with International Participation, 06-09.10.2007, Struga. Special issues of Macedonian Ecological Society, Vol. 8, Skopje, 2008.
20. Lacheva M. Gasteroid fungi of Agaricaceae (Agaricales) in Thracian Lowland. – In: Petrova, A. [ed.], [Proceedings of the 7th National Conference of Botany], 29-30 Sep 2011, Sofia, 2012a. – pp. 245-250. Bulg. Bot. Soc., Sofia. (In Bulgarian)
21. Lacheva M. *Rhizopogon* and *Scleroderma* (*Boletales*) in Bulgaria. – In: Petrova, A. [ed.], [Proceedings of the 7th National Conference of Botany], 29-30 Sep 2011, Sofia, 2012b. – pp. 245-250. Bulg. Bot. Soc., Sofia.
22. Lacheva M. New data of some rare larger fungi of Agaricaceae (Agaricales) in Bulgaria. Science and Technologies, 2012c. – 2(6): 24-29.
23. Moreno G., Lizárraga M., Esqueda M and Coronado M.L. Contribution to the study of gasteroid and secotioid fungi of Chihuahua, Mexico. Mycotaxon, 2010. – 112: 291-315.
24. Wright J.E. The genus *Tulostoma* (Gasteromycetes). A World Monograph. J. Cramer, Berlin-Stuttgart, 1987.

СОПОСТАВЛЕНИЕ ЭФФЕКТОВ ПРОДУКТОВ РАЗРУШЕНИЯ *S. PYOGENES* НА МОНОЦИТЫ КРОВИ И КЛЕТКИ ЛИНИИ THP-1

Лебедева Александра Михайловна

Научный сотрудник ФГБУ «НИИЭМ» СЗО РАМН, г. Санкт-Петербург

Бурова Лариса Александровна

Доктор мед. наук, ФГБУ «НИИЭМ» СЗО РАМН, г. Санкт-Петербург

Фрейдлин Ирина Соломоновна

Доктор мед. наук, член-корр. РАН, профессор, ФГБУ НИИЭМ СЗО РАМН, г. Санкт-Петербург

Самойлова Кира Александровна

Доктор биол. наук, профессор, ФГБУН ИЦ РАН, г. Санкт-Петербург

Введение. При инвазивной стрептококковой инфекции в крови накапливаются как продукты, секретируемые живыми клетками, так и продукты их деградации. Лейкоциты крови становятся мишениями для этих продуктов.

В качестве модели моноцитов крови используют перевиваемую линию клеток THP-1. Эти клетки по своим генотипическим и фенотипическим характеристикам близки к моноцитам периферической крови человека. Однако клетки THP-1, как и клетки других перевиваемых линий, несут черты злокачественно трансформированных клеток. Это может оказывать влияние на различия характеристики ответа клеток THP-1 и моноцитов крови человека на действие продуктов разрушения бактерий.

Цель данного исследования состояла в сравнении чувствительности моноцитов крови человека и клеток перевиваемой линии THP-1 к продуктам деградации *S. pyogenes*.

Материалы и методы. EA.hy 926 – линия эндотелиальных клеток (ЭК) человека; получена путем гибридизации первичной линии клеток HUVEC с клетками карциномы легкого А-549, предоставлена Dr. Cora-Jean C. Edgell (Университет Северной Каролины, США). По основным фенотипическим, морфологическим и функциональным характеристикам клетки линии EA.hy 926 схожи с эндотелиальными клетками макрососудов человека.

Мононуклеарные лейкоциты выделяли из периферической крови условно здоровых доноров. Разделение фракций гранулоцитов и мононуклеарных лейкоцитов проводили с помощью осаждения клеток на градиенте плотности фиколл-верографина.

Клетки инкубировали при 37°C во влажной атмосфере с 5% CO₂. Во всех экспериментах жизнеспособность составляла не менее 95%.

Супернатант разрушенных стрептококков (СРС) был приготовлен из *Streptococcus pyogenes* серологической группы А (типа M22, штамм AL168). Данный штамм

был предоставлен Dr. Lindahl (Отдел лабораторной медицины Лундского Университета, Лунд, Швеция). Использовали СРС в разведениях 1:50-1:2000. Все исследуемые концентрации были нетоксичны для клеток.

Для оценки адгезионной активности моноцитов крови супензию мононуклеарных лейкоцитов вносили в лунки, содержащие монослои ЭК. Одновременно вносили СРС и инкубировали в течение 1 часа. В качестве контроля использовали полную культуральную среду (ПКС) с 10% сыворотки. Оценку количества адгезировавших моноцитов проводили с помощью проточного цитофлуориметра Epics Altra («Beckman Coulter», США) с использованием моноклональных антител (мАт) против поверхности молекулы CD14, меченых FITC (для выделения популяции моноцитов крови). Результаты выражали в процентах от числа спонтанно адгезировавших клеток.

В отдельных экспериментах проводили предварительную 24-часовую инкубацию ЭК с СРС.

Для изучения миграции и трансэндотелиальной миграции (ТЭМ) моноцитов крови и клеток линии THP-1 использовали модифицированные камеры Бойдена (трансвеллы) с диаметром пор 8 мкм; трансвеллы помещали в лунки 24-луночного планшета. В верхние камеры трансвелл вносили супензию мононуклеарных лейкоцитов. В нижние камеры вносили культуральную среду (контроль) или среду с исследуемыми веществами и инкубировали 2 часа. Для оценки ТЭМ супензию мононуклеарных лейкоцитов вносили в верхние камеры трансвелл, содержащие монослои ЭК. Время инкубации составляло 2,5 часа. Оценку количества мигрировавших клеток проводили с помощью проточного цитофлуориметра Navios («Beckman Coulter», США) с использованием мАт против CD14, меченых FITC (для выделения популяции моноцитов крови) и коммерческих наборов Flow-count

Fluorospheres («Beckman Coulter», США). Результаты выражали в процентах от числа спонтанно мигрировавших клеток.

В отдельных экспериментах по изучению миграции моноцитов в верхние камеры трансвелл вносили токсин коклюша (100 нг/мл).

Оценку достоверности различий между средними значениями в контрольных и опытных выборках проводили с использованием t-критерия Стьюдента с помощью пакета программ Microsoft Office Excel 2010 и STATISTICA 6.0.

Результаты и обсуждение. Свойства клеток перевиваемой моноцитоподобной линии THP-1 подробно изучены и во многом близки к моноцитам крови человека [3, 6]. Однако в наших исследованиях выявились существенные различия в характере ответа клеток THP-1 и моноцитов крови человека на действие продуктов разрушения пигенного стрептококка.

Ранее нами было показано, что в присутствии СРС адгезия клеток линии THP-1 к эндотелию усиливается [1]. СРС так же повышал миграцию и трансэндотелиальную миграцию этих клеток [2]. Стимулирующий эффект СРС на эти процессы был связан с хемоаттрактным действием продуктов разрушения стрептококков и не связан с изменением свойств эндотелиальных клеток.

Как и адгезия клеток линии THP-1, адгезия моноцитов крови усиливается в присутствии СРС (рис. 1). Для оценки вклада эндотелиальных клеток и моноцитов в этот процесс изучали интенсивность их адгезии в тех же условиях, но после предварительной инкубации эндотелиальных клеток с СРС. Результаты экспериментов показали, что преинкубация эндотелиальных клеток с СРС не оказывала влияния на интенсивность адгезии моноцитов (рис. 1).

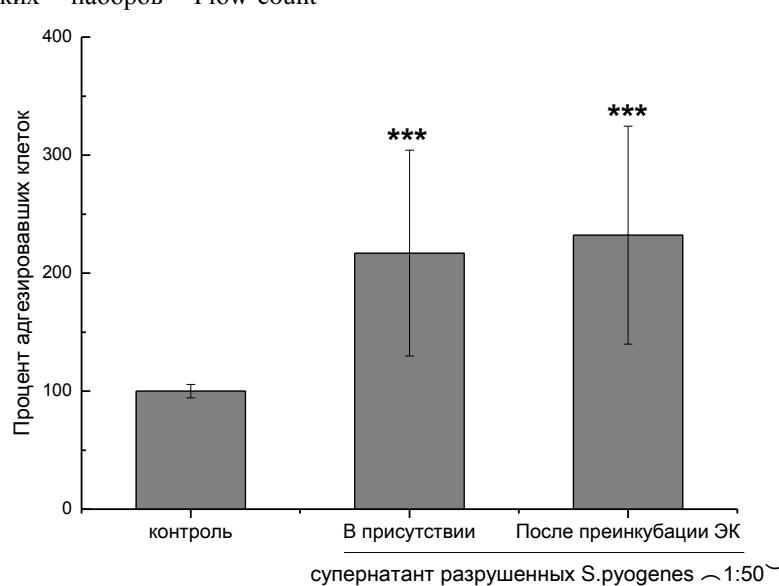


Рисунок 1. Влияние супернатанта разрушенных стрептококков на адгезию моноцитов крови к монослою эндотелиальных клеток.

Полученные данные позволяют предположить, что усиление адгезии моноцитов, вызванное СРС, не было связано с изменением свойств эндотелиальных клеток.

Влияние СРС на миграцию моноцитов крови было разнонаправленным и зависело от концентрации СРС и индивидуальной чувствительности доноров к продуктам деградации *S. ryogenes* (рис. 2). Согласно литературным данным, одно и то же вещество, в зависимости от концентрации, может оказывать разнонаправленное действие на

миграцию лейкоцитов: в низких концентрациях может выступать в качестве хемоаттрактанта, а при высоких концентрациях – действовать как хеморепеллент [4]. Таким образом, можно предположить, что разнонаправленный эффект СРС на миграцию моноцитов крови в разных концентрациях связан с наличием в его составе подобного фактора.

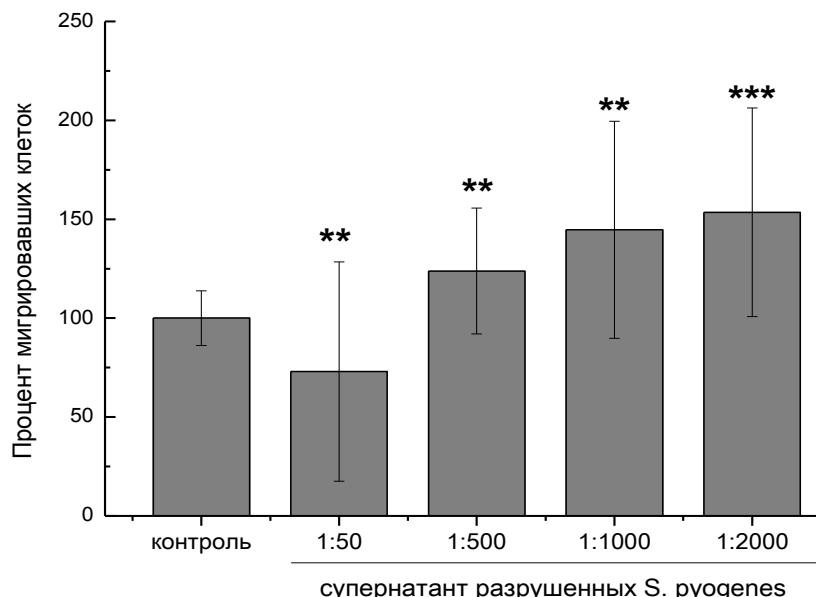


Рисунок 2. Влияние супернатанта разрушенных стрептококков на интенсивность миграции моноцитов крови человека.

В регуляции хемотаксиса и трансэндотелиальной миграции клеток участвуют сигналы от рецепторов, связанных с G-белками (GPCR). Их лигандами являются хемоаттрактные белки – хемокины, компоненты комплемента, компоненты бактерий [7]. На этапе роллинга и адгезии сигналинг от GPCR приводит к изменению конформации интегринов и повышению их аффинности и авидности. Кроме того сигналы от GPCR опосредуют направленную миграцию лейкоцитов к базальной поверхности ЭК и далее во внеклеточном матриксе [5, 7]. Одним из ингибиторов сигнала от GPCR является токсин коклюша.

Предположив, что СРС проявляет свойства хемоаттрактанта в отношении моноцитов, мы провели ингибиторный анализ с токсином коклюша (рис. 3).

Токсин коклюша снижал индуцированную СРС миграцию моноцитов крови до спонтанного уровня. Чувствительность к токсину доказывает, что влияние СРС на миграцию моноцитов было опосредовано взаимодействием GPCR на моноцитах с хемоаттрактантом в составе СРС.

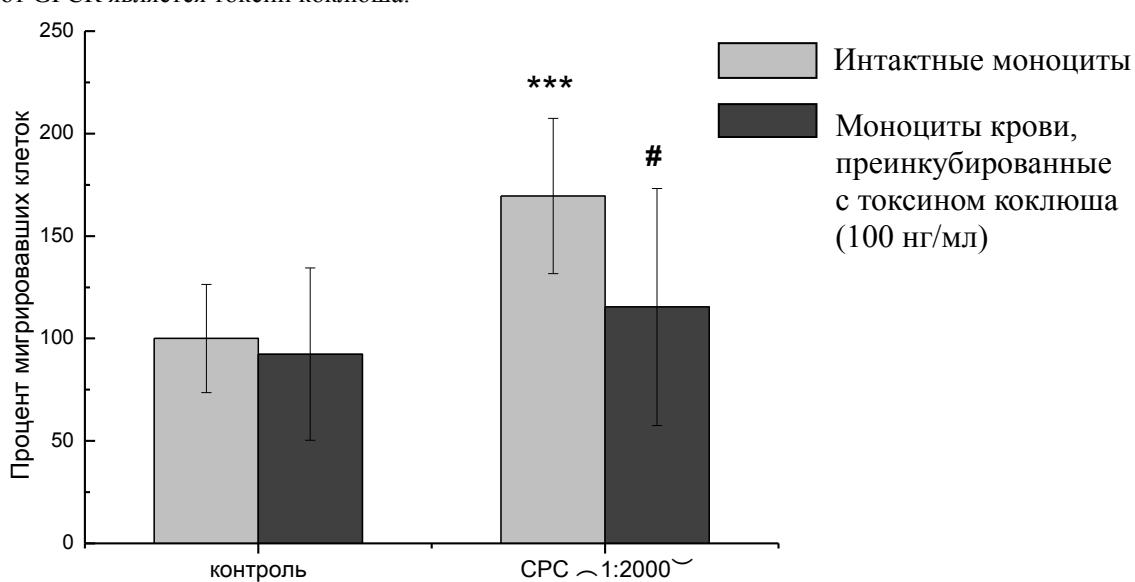


Рисунок 3. Влияние супернатанта разрушенных стрептококков на интенсивность миграции моноцитов (интактных и преинкубированных с токсином коклюша).

Несмотря на то, что влияние СРС в некоторых концентрациях на адгезию и миграцию моноцитов и клеток ТНР-1 было сходным, влияние СРС на трансэндотелиальную миграцию этих клеток было противоположным (рис. 4).

В отличие от трансмиграции ТНР-1, трансэндотелиальная миграция моноцитов снижалась в присутствии

СРС. Это можно объяснить тем, что в используемой модели взаимодействия моноцитов и эндотелиальных клеток, в присутствии СРС секретируются факторы, ингибирующие трансмиграцию моноцитов.

Различная чувствительность моноцитов и клеток ТНР-1 к хемоаттрактанту в составе СРС может быть связана с разной концентрацией соответствующих рецепторов на этих клетках.

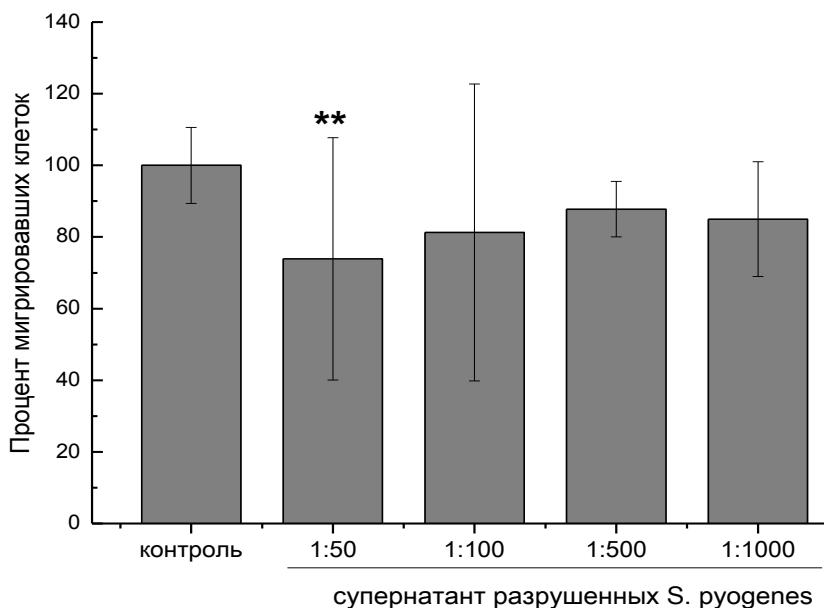


Рисунок 4. Влияние супернатанта разрушенных стрептококков на трансэндотелиальную миграцию моноцитов крови человека.

Список литературы.

- Лебедева А.М. Изменения активности адгезии моноцитов к эндотелиальным клеткам под влиянием компонентов *Streptococcus pyogenes* / Лебедева А.М., Старикова Э.А., Бурова Л.А., Фрейдлин И.С. // Медицинская иммунология. – 2011. – т. 13, № 6. – с. 581-588.
- Старикова Э.А. Механизмы усиления трансэндотелиальной миграции моноцитоподобных клеток THP-1 под влиянием компонентов пиогенного стрептококка/ Старикова Э.А., Лебедева А.М., Актуреева Н.А., Бурова Л.А., Фрейдлин И.С. // Медицинская иммунология. – 2013. – т. 15, № 5. – с. 457-464.
- Goda S. CX3C-chemokine, fractalkine-enhanced adhesion of THP-1 cells to endothelial cells through integrin-dependent and -independent mechanisms / Goda S., Imai T., Yoshie O. // Journal of Immunology. – 2000. – Vol. 164 (8). – P. 4313–4320.
4. Huttenlocher A. Reverse leukocyte migration can be attractive or repulsive / Huttenlocher A., Poznansky M. C. // Trends in Cell Biology. – 2008. – Vol. 18 (6). – P. 298–306.
5. Imhof B. A. Adhesion mechanisms regulating the migration of monocytes. Nature Reviews / Imhof B. A, Aurrand-Lions M. // Immunology. – 2004. – Vol. 4 (6). – P. 432–444.
6. Kawakami A. Apolipoprotein CIII-induced THP-1 cell adhesion to endothelial cells involves pertussis toxin-insensitive G protein- and protein kinase C alpha-mediated nuclear factor-kappaB activation / Kawakami A., Aikawa M., Nitta N. et al. // Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology. – 2007. – Vol. 27 (1). – P. 219–225.
7. Penela P. Role of G protein-coupled receptor kinases in cell migration / Penela P., Nogués L., Mayor F. // Current Opinion in Cell Biology. – 2014. – Vol. 27. – P. 10–17.

«К ВАМ ЕДЕТ РЕВИЗОР!»

Лупунчук Маргарита Юрьевна

Генеральный директор ООО НПЦ «ЮМАН», экоаудитор, г. Сургут

Винокурова Александра Владимировна

Инженер по охране окружающей среды (Эколог), ООО НПЦ «ЮМАН», г. Сургут

«Я пригласил вас, господа, с тем, чтобы сообщить вам пренеприятное известие: к нам едет ревизор».

(Н.В. Гоголь, «Ревизор»)

Каждое предприятие в своей жизни переживает напряженный период, когда получает уведомление о про-

Проверки проводятся не только в крупных градообразующих компаниях и государственных учреждениях, но и у индивидуальных предпринимателей и в небольших организациях. У любого предпринимателя образуются отходы производства и потребления, а значит, существуют и экологические обязательства.

В настоящее время усилился контроль за выполнением требований природоохранного законодательства, и

ведении проверки на предмет соблюдения природоохранного законодательства. Что будут проверять? Какая документация должна быть у предприятия? Какова возможная сумма штрафов? За какие нарушения предусмотрены максимальные штрафы? Эти и многие другие вопросы сразу возникают у руководителя организации.

увеличились суммы возможных штрафов. Например, 2 июля 2013 года Президент Российской Федерации Владимир Путин подписал Федеральный Закон N 173-ФЗ «О внесении изменений в статьи 8.14 и 8.21 Кодекса Российской Федерации об административных правонарушениях». А Федеральным законом от 21 октября 2013 г. N 282-ФЗ глава 8 КоАП дополнена статьей 8.45.