

Влияние обработки стафилококковым токсином на моноциты и нейтрофилы периферической крови человека *in vitro*

Н.А.Никитенко, Л.М.Шаблій

Луганский государственный медицинский университет, Луганский национальный аграрный университет
Луганск, Украина

Статья посвящена изучению влияния стафилококкового токсина на фагоцитарную и секреторную активность, метаболический статус, апоптоз и некроз моноцитов и нейтрофилов периферической крови человека *in vitro*.

Ключевые слова: моноциты, нейтрофилы, стафилококковый токсин, функции, метаболизм, апоптоз.

ВВЕДЕНИЕ

Известно, что развитие инфекционной болезни во многом определяется патогенными свойствами возбудителя [1, 4, 6, 10]. Развитию патологических процессов, обусловленных золотистым стафилококком, способствуют не только нарушения иммунных механизмов защиты организма человека, а также широкий спектр факторов патогенности, имеющийся у данного микроорганизма, наиболее агрессивным из которых является стафилококковый экзотоксин [7, 8]. Активно выделяясь при вегетации золотистого стафилококка в окружающую среду, экзотоксин многогранно действует на органы и ткани макроорганизма, в том числе и на иммунную систему [2, 3]. Особенная агрессивность золотистого стафилококка в отношении клеточного звена системного иммунитета связана с фракционной неоднородностью стафилококкового экзотоксина, фракции которого обладают разными механизмами действия на иммунокомпетентные клетки и, прежде всего, моноциты и нейтрофилы, играющие ключевые роли в формировании специфических и неспецифических механизмов защиты [5, 9, 11].

Работа является фрагментом плановой научной работы кафедры патофизиологии Лу-

ганского государственного медицинского университета «Воспаление как результат действия бактерий» (регистрационный номер 0198U005713).

Целью работы было изучить влияние обработки стафилококковым токсином на моноциты и нейтрофилы периферической крови человека *in vitro*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Нами использовано 778 культур моноцитов и нейтрофилов периферической крови 66 практически здоровых доноров-мужчин в возрасте 19-25 лет. Работу выполняли с соблюдением всех положений биоэтики. В исследованиях использовали стафилококковый токсин производства Института эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф.Гамалеи (серия 110-2, Lh=0,21) в разведениях (-3), (-6) и (-12) Ig. Токсин разводили средой 199. Определение фагоцитарной активности нейтрофилов и моноцитов проводили чашечным методом. Подсчитывали фагоцитарный индекс (ФИ) – процент фагоцитирующих клеток, фагоцитарное число (ФЧ) – количество поглощенных стафилококков на одну фагоцитирующую клетку.

Содержание интерлейкинов (ИЛ-1, ИЛ-6, ИЛ-8), фактора некроза опухоли (ФНО- α) и интерферона (ИФН- α) определяли в супернатантах клеток, полученных после центрифугирования, иммуноферментным методом с использованием тест-систем производства фирмы R&D Systems (США). Перед определением внутриклеточного содержания циклических нуклеотидов, а также диеновых конъюгатов (ДК), малонового диальдегида (МДА), активности каталазы и супероксиддисмутазы (СОД) клеточные культуры лизировали дистиллированной водой. Определение ДК ненасыщенных высшихжирныхкислотосуществляли пометоду

ТАБЛИЦА 1

Влияние стафилококкового токсина на фагоцитарную активность моноцитов и нейтрофилов крови здоровых доноров in vitro

Показатель	Интактные клетки (n=37)	Концентрация стафилококкового токсина		
		(-12) lg	(-6) lg	(-3) lg
ФИ моноцитов, %	83,6±4,2	69,3±3,5*	41,5±2,1***	16,7±0,8***
ФЧ моноцитов, у.е.	5,3±0,3	3,8±0,2***	2,1±0,1***	0,9±0,05***
ФИ нейтрофилов, %	89,7±4,5	72,7±3,6**	48,2±2,4***	21,5±1,1***
ФЧ нейтрофилов, у.е.	9,4±0,5	7,5±0,4**	4,6±0,2***	1,7±0,1***

Примечания: * – p<0,05; ** – p<0,01; *** – p<0,001 относительно интактных клеток.

И.Д.Стальной (1977), МДА – по И.Д.Стальной и Т.Г.Гаришвили (1977), активности каталазы – по М.А.Королюк и соавт. (1988), СОД – спектрофотометрическим методом. Интегральный коэффициент К (у.е.) высчитывали по формуле: $K = (DK + MDA) / (\text{каталаза} + \text{СОД})$. Определение содержания циклических аденозина и гуанозина монофосфатов (цАМФ и цГМФ) в нейтрофилах и моноцитах (в концентрации 1 млн клеток в 1 мл) проводили радиоиммунным методом с использованием коммерческих тест-систем фирмы Amersham (Великобритания). Количество апоптировавших и некротизированных клеток определяли морфологическим методом. Полученные цифровые результаты обрабатывали статистически на персональном компьютере методами вариационной статистики. Достаточной считалась вероятная ошибка менее 5% (p 0,05).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Как следует из данных, приведенных в табл. 1, интактные нейтрофилы и моноциты проявляли фагоцитарную активность.

Обработка моноцитов и нейтрофилов стафилококковым токсином вела к снижению значений ФИ и ФЧ, при этом наибольшее подавление фагоцитарной активности наблюдали при разведении токсина в (-3) lg. Наименее выраженное подавление фагоцитарной активности нейтрофилов и моноцитов регистрировали при разведении токсина в (-12) lg. В целом, независимо от разведения токсина, его антифагоцитарная активность выражалась в уменьшении ФИ и ФЧ как у моноцитов, так и у нейтрофилов. Наиболее чувствительными к воздействию токсина оказались моноциты.

Нами установлено, что токсин существенно изменял секреторную активность моноцитов и нейтрофилов, при этом малые дозы токсина вызывали активацию секреции интерлейкинов и других медиаторов воспаления, тогда как высокие концентрации угнетали секреторную активность указанных клеток (табл. 2). При наименьшей дозе стафилококкового токсина (разведение (-12) lg) моноциты крови человека усиливали секрецию интерлейкинов, ФНО-α и ИФН-α с преобладанием секреции ИЛ-1.

ТАБЛИЦА 2

Влияние стафилококкового токсина на секреторную активность моноцитов и нейтрофилов крови здоровых доноров in vitro

Показатель, пг/мл	Интактные клетки (n=43)	Концентрация стафилококкового токсина		
		(-12) lg	(-6) lg	(-3) lg
Моноциты				
ИЛ-1	15,7±0,8	48,2±2,4***	19,9±1**	6,5±0,3***
ИЛ-6	3,1±0,2	4,2±0,2***	8,3±0,4***	10,9±0,5***
ИЛ-8	1,9±0,1	2,3±0,1**	4,4±0,2***	6,0±0,3***
ФНО	2,6±0,1	3,0±0,2	4,7±0,2***	7,4±0,4***
ИФН	7,8±0,4	20,7±1***	9,2±0,5*	1,3±0,07***
Нейтрофилы				
ИЛ-6	1,2±0,05	3,4±0,2***	2,2±0,1***	1,4±0,07*
ИЛ-8	0,7±0,03	1,8±0,09***	1,3±0,07***	0,9±0,04***
ФНО	0,5±0,03	1,5±0,08***	1±0,05***	0,6±0,03*

Примечания: * – p<0,05; ** – p<0,01; *** – p<0,001 относительно интактных клеток.

ТАБЛИЦА 3

Влияние стафилококкового токсина на ПОЛ и систему АОЗ моноцитов и нейтрофилов здоровых доноров in vitro

Показатель	Интактные клетки (n=39)	Концентрация стафилококкового токсина		
		(-12) lg	(-6) lg	(-3) lg
Моноциты				
ДК, мкмоль/л	0,552±0,028	0,599±0,03	0,664±0,031*	0,795±0,04***
МДА, мкмоль/л	0,307±0,015	0,338±0,017	0,363±0,018*	0,479±0,024***
Каталаза, мкмоль/ч*л	4,25±0,21	4,03±0,2	3,58±0,18 *	3,14±0,16***
СОД, МЕ/мг*Нб	1,77±0,09	1,56±0,08 *	1,48±0,07*	1,19±0,06***
К, у.е.	0,143±0,007	0,168±0,008*	0,203±0,01***	0,294±0,015***
Нейтрофилы				
ДК, мкмоль/л	0,486±0,02	0,551±0,022*	0,573±0,028*	0,743±0,037***
МДА, мкмоль/л	0,251±0,01	0,284±0,014	0,296±0,015*	0,346±0,017***
Каталаза, мкмоль/ч*л	4,07±0,2	3,96±0,19	3,42±0,17*	3,16±0,16 ***
СОД, МЕ/мг*Нб	1,54±0,08	1,36±0,07	1,21±0,06**	1,05±0,05***
К, у.е.	0,131±0,006	0,157±0,008*	0,188±0,009***	0,259±0,013***

Примечания: * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$ относительно интактных клеток.

На втором месте по интенсивности секреции находился ИФН- α . В то же время интенсивность секреции провоспалительных медиаторов – ИЛ-6, ИЛ-8 и ФНО- α существенно уступала таковой для ИЛ-1 и ИФН- α . Сходные изменения наблюдались также в отношении продукции медиаторов нейтрофилами.

Нами установлено, что обработка токсином моноцитов и нейтрофилов периферической крови человека *in vitro* интенсифицировала процессы перекисного окисления липидов (ПОЛ), что сопровождалось увеличением внутриклеточного содержания в моноцитах и нейтрофилах промежуточного и конечного продуктов ПОЛ – ДК и МДА (табл. 3). Действие токсина на ферментативную систему антиоксидантной защиты (АОЗ) выражалось в уменьшении активности внутриклеточных каталазы и СОД. В результате разнонаправленного изме-

нения процессов ПОЛ и активности ферментов системы АОЗ значение интегрального коэффициента К, характеризующего баланс между ПОЛ и системой АОЗ, увеличивалось. Влияние стафилококкового токсина на активность ПОЛ и ферментативную систему АОЗ было дозозависимым. Наименьшие изменения ПОЛ и недостаточность ферментов АОЗ вызывал токсин в разведении (-12) lg, наиболее значительные сдвиги в системе ПОЛ/АОЗ регистрировали в нейтрофилах и моноцитах, подвергшихся воздействию стафилококкового токсина в разведении (-3) lg.

Нами установлено, что присутствие токсина в среде культивирования моноцитов и нейтрофилов человека влияет на содержание циклических нуклеотидов в данных клетках (табл. 4). При этом направленность изменений внутриклеточного содержания цАМФ и

ТАБЛИЦА 4

Влияние стафилококкового токсина на систему адениловых нуклеотидов моноцитов и нейтрофилов здоровых доноров in vitro

Показатель, пкмоль/6lg клеток	Интактные клетки (n=43)	Концентрация стафилококкового токсина		
		(-12) lg	(-6) lg	(-3) lg
Моноциты				
цАМФ	2,6±0,1	2,8±0,1	4,0±0,2***	5,6±0,3***
цГМФ	3,3±0,2	4,2±0,2**	3,6±0,2	2,8±0,1*
цАМФ/цГМФ, у.е.	0,8±0,04	0,7±0,04	1,1±0,06***	2±0,1***
Нейтрофилы				
цАМФ	2,4±0,1	2,1±0,1*	3,4±0,2***	4,1±0,2***
цГМФ	2,8±0,1	3,5±0,2**	2,8±0,1	2,3±0,1**
цАМФ/цГМФ, у.е.	0,9±0,04	0,6±0,03***	1,2±0,06***	1,8±0,1***

Примечания: * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$ относительно интактных клеток.

ТАБЛИЦА 5

Влияние стафилококкового токсина на апоптоз моноцитов и нейтрофилов крови здоровых доноров *in vitro*

Показатель, %	Интактные клетки (n=43)	Концентрация токсина		
		(-12) lg	(-6) lg	(-3) lg
Нормальные моноциты	98±1,4	94,3±1,2	98,7±4,4*	65,2±3,3***
Апоптирующие моноциты	0,65±0,03	1,77±0,09***	6,07±0,3***	12,9±0,6***
Некротизированные моноциты	1,2±0,06	1,35±0,07	3,48±0,07***	18,9±0,9***
Нормальные нейтрофилы	97±1,2	91,6±1,4**	75,2±2,3***	41,5±1,2***
Апоптирующие нейтрофилы	0,8±0,04	3,1±0,15***	13,6±0,7***	31,8±1,6***
Некротизированные нейтрофилы	1,5±0,08	3,3±0,17***	8,2±0,4***	23,6±1,2***

Примечания: * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$ относительно интактных клеток.

цГМФ в моноцитах и нейтрофилах различалась в зависимости от действующей концентрации стафилококкового токсина. Малые концентрации токсина стимулировали накопление внутри клеток-мишеней цГМФ, в связи с чем значение коэффициента цАМФ/цГМФ, характеризующего баланс в системе циклических нуклеотидов, снижалось или имело тенденцию к снижению в зависимости от вида клеток-мишеней. Напротив, высокие действующие концентрации токсина вызывали увеличение внутриклеточного содержания цАМФ, при неизменном или сниженном уровне внутриклеточного цГМФ, в связи с чем значение коэффициента цАМФ/цГМФ для моноцитов и нейтрофилов существенно увеличивалось.

Нами установлено, что обработка токсином моноцитов и нейтрофилов *in vitro* стимулирует апоптоз и некроз указанных клеток. При этом степень выраженности апоптогенного и некротизирующего влияния токсина увеличивалась по мере возрастания его концентрации. Наименьший удельный вес апоптированных и некротизированных нейтрофилов и моноцитов наблюдали при малой действующей концентрации стафилококкового токсина (разведение (-12) lg), а наибольший – при высокой концентрации токсина (разведение (-3) lg) (табл. 5).

Как следует из приведенных в табл. 5 данных, к малой действующей концентрации токсина (разведение (-12) lg) моноциты оказались более устойчивыми, что выражалось в более низком удельном весе апоптировавшихся и некротизированных клеток по сравнению с аналогичными показателями для нейтрофилов. Увеличение действующей концентрации стафилококкового токсина до разведения (-6) lg сопровождалось увеличением удельного веса апоптировавшихся и некротизированных нейтрофилов и моноцитов. Следует отметить тот

факт, что как в популяции моноцитов, так и в популяции нейтрофилов удельный вес апоптировавшихся моноцитов и нейтрофилов, подвергшихся влиянию стафилококкового токсина в разведении (-6) lg, преобладал над удельным весом некротизированных клеток.

Воздействие на моноциты и нейтрофилы крови человека стафилококковым токсином в разведении (-3) lg (наибольшая из использованных концентраций токсина) вызывало увеличение уровней апоптировавшихся и некротизированных клеток по сравнению с таковыми в предыдущих вариантах эксперимента.

ВЫВОДЫ

Таким образом, нами показано, что стафилококковый токсин обладает выраженным биологическим действием в отношении моноцитов и нейтрофилов периферической крови человека *in vitro*, которое является дозозависимым. Последнее выражается в отрицательном изменении фагоцитарной и секреторной активности нейтрофилов и моноцитов, в нарушении их метаболического статуса (активация ПОЛ, недостаточность ферментативной системы антиоксидантной защиты, дисбаланс в системе циклических нуклеотидов с преобладанием цАМФ над цГМФ), а также в усилении апоптоза и некроза в указанных клетках. Отрицательное воздействие токсина увеличивалось по мере нарастания его концентрации и было наибольшим при разведении токсина в (-3) lg, а наименьшие нарушения под влиянием токсина наблюдались при его разведении в (-12) lg. Более чувствительными к действию токсина были нейтрофилы. Данные, полученные в результате настоящего исследования, будут использованы нами для разработки этиопатогенетических методов лечения инфекционных заболеваний бактериальной этиологии.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бухарин О.В. Персистенция патогенных бактерий / О.В.Бухарин. — М.: Медицина, 1999. — 368 с.
2. Вплив стафілококів на показники клітинного імунітету / І.С.Гайдаш, В.В.Флегонтова, Р.І.Сидорчук [та ін.] // Інфекційні хвороби. — 2000. — №3. — С. 9-11.
3. Вплив стафілококів на показники клітинного імунітету у хворих на внутрішньошпитальні інфекції / І.С.Гайдаш, В.В.Флегонтова, Р.І.Сидорчук [та ін.] // Український медичний альманах. — 2000. — №1. — С. 35-36.
4. Дерябин Д.Г. Информативность биологических свойств возбудителя при прогнозировании длительности течения гнойно-воспалительных заболеваний стафилококковой этиологии / Д.Г.Дерябин, П.П.Курлаев // Вестник хирургии. — 1999. — №1. — С. 45-48.
5. Калина Т.И. Персистенция условно-патогенного стафилококка и нарушение иммунного гомеостаза у часто и длительно болеющих детей / Т.И.Калина, Р.В.Федоров, Е.Р.Федорова // Педиатрия. — 1991. — №5. — С. 46-50.
6. Козлов В.К. Сепсис: иммунопатогенез тяжелого сепсиса / В.К.Козлов // Клінічна імунологія, алергологія, інфектологія. — 2009. — №1-2. — С. 17-24.
7. Новиков Д.К. Влияние стафилококкового токсина на рецепторы и функцию лимфоцитов / Д.К.Новиков, И.А.Новикова, В.П.Булавкин // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. — 1987. — №4. — С. 63-66.
8. Смирнов В.В. Стафилококк (биологически активные субстанции, иммунный ответ на антигены) / В.В.Смирнов, А.Е.Вернигора. — К.: Наукова думка, 1988. — 246 с.
9. Флегонтова В.В. Механизмы реализации иммуносупрессивных свойств условно-патогенных бактерий — этиологических агентов гнойно-воспалительных заболеваний: Дис. ... д.мед.н.: 03.00.07 / В.В.Флегонтова. — Луганськ, 2004. — 335 с.
10. Шпитальні інфекції на межі тисячоліть / І.С.Гайдаш, В.В.Флегонтова, Н.К.Казимірко [та ін.]. — Луганськ: Елтон-2, 2000. — 65 с.
11. Effects of staphylococcal enterotoxins on human neutrophil functions and apoptosis / D.A.Moulding, C.Walter, C.A.Hart, S.W.Edwards // Infection and Immunity. — 2009. — №5. — P. 2312-2318.

Н.О.Нікітенко, Л.М.Шаблій. Вплив обробки стафілококовим токсином на моноцити і нейтрофіли периферійної крові людини *in vitro*. Луганськ, Україна.

Ключові слова: моноцити, нейтрофіли, стафілококовий токсин, функції, метаболізм, апоптоз.

*Стаття присвячена вивченню впливу стафілококового токсину на фагоцитарну та секреторну активність, метаболічний статус та апоптоз моноцитів і нейтрофілів периферійної крові людини *in vitro*.*

N.A.Nikitenko, L.M.Shabliy. Influence of staphylococcal toxin treatment on peripheral human blood monocytes and neutrophils *in vitro*. Lugansk, Ukraine.

Key words: monocytes, neutrophils, staphylococcal toxin, functions, metabolism, apoptosis.

*The article is devoted to the study of staphylococcal toxin influence on the phagocytosis, secretory activity, metabolic status and apoptosis of human blood monocytes and neutrophils *in vitro*.*

Надійшла до редакції 19.12.2009 р.