

4. Peacock S. J., Moore C. E., Justice A. et al. Virulent Combinations of Adhesin and Toxin Genes in Natural Populations of *Staphylococcus aureus* // Infect. and Immun. – 2002. – 70, No 9. – P. 4987–4996.
5. Hussain M., Becker K., Eiff C. Analogs of Eap protein are conserved and prevalent in clinical *Staphylococcus aureus* isolates // Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology. – 2001. – 8, No 6. – P. 1271–1276.
6. Олешко Г. М., Любченко Г. А. Адгезивні властивості поверхневого білка стафілококів // Доп. НАН України. – 2006. – № 12. – С. 158–161.
7. Новые методы анализа аминокислот, пептидов и белков / Под ред. Ю. А. Овчинникова. – Москва: Мир, 1974. – 420 с.
8. Козаренко Т. Д. Ионообменная хроматография аминокислот. – Новосибирск: Наука, 1975. – 230 с.
9. Химическая энциклопедия. Большая российская энциклопедия. – Москва: Мир, 1998. – Т. 1–5.
10. Якубку Х.-Д., Ешкайт Х. Аминокислоты. Пептиды. Белки. – Москва: Мир, 1985. – 456 с.
11. Практикум по биохимии / Под ред. С. Е. Северина, Г. А. Соловьевой. – Москва: Изд-во Моск. ун-та, 1989. – 509 с.
12. Руководство по эпидемиологии инфекционных болезней / Под ред. В. И. Покровского. – Москва: Медицина, 1993. – Т. 2. – 463 с.
13. Harraghy N., Hussain M., Haggan A. et al. The adhesive and immunomodulating properties of the multi-functional *Staphylococcus aureus* protein Eap // Microbiology. – 2003. – 149. – P. 2701–2707.

Київський національний університет
ім. Тараса Шевченка

Надійшло до редакції 19.06.2007

УДК 616.94-02.617-089

© 2008

В. В. Позур, Л. М. Сківка, Г. П. Потебня

Вплив пептидоглікану *Staphylococcus aureus* Wood 46 на киснезалежний метаболізм макрофагів і нейтрофілів

(Представлено академіком НАН України В. Ф. Чехуном)

The effect of peptidoglycan from Staphylococcus aureus Wood 46 on the cytotoxic activity of macrophages and neutrophils is investigated. It is shown that bacterial peptidoglycan increases spontaneous and stimulated TPA (respiratory burst) in both populations of phagocytes. More sensible to murein is neutrophil. The action of peptidoglycan from S. aureus Wood 46 on the metabolism of these cells is dose-dependent with maximal stimulating effect at the addition of 10 mkg/ml of peptidoglycan in combination with TPA.

Цитотоксична дія, заснована на продукції активних форм кисню, властива широкому спектру клітин організму, серед яких особливе значення належить макрофагам і нейтрофілам. Незважаючи на те що як макрофаги, так і нейтрофіли є ефекторами природної резистентності, їх функції в імунній системі відрізняються. Макрофаги локалізовані переважно в тканинах [1–3]. У системі мононуклеарних фагоцитів макрофаги виконують функцію санітарів організму: розпізнають, поглинають і знешкоджують або лізують різні чужорідні агенти, а також власні клітини зі зміненими поверхневоклітинними молекулами, наприклад, у результаті загибелі їх шляхом апоптозу [4]. Популяція гранулоцитів, до якої входять нейтрофіли, є найбільшою (50–70%) субпопуляцією лейкоцитів крові. Першочерговою функцією нейтрофілів є генерація запалення. Саме вони першими локалізуються в місці мікробної

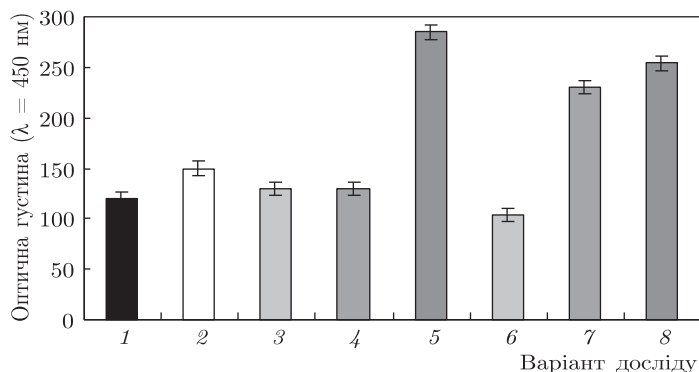


Рис. 1. Вплив пептидоглікану на спонтанну та стимульовану цитотоксичну активність перитонеальних макрофагів мишей.

Варіант досліджу: 1 — контроль; 2 — ТРА; 3 — ПГ в концентрації 10 мкг/мл; 4 — ПГ в концентрації 100 мкг/мл; 5 — ПГ в концентрації 250 мкг/мл; 6 — ТРА + ПГ в концентрації 10 мкг/мл; 7 — ТРА + ПГ в концентрації 100 мкг/мл; 8 — ТРА + ПГ в концентрації 250 мкг/мл

інвазії і характеризуються надзвичайно широким спектром продукованих антимікробних біологічно активних медіаторів [5, 6]. Незважаючи на велике різноманіття токсичних сполук нейтрофілів, найбільш дієвими в антимікробному захисті вважається саме метаболізм, заснований на продукції реактивних похідних кисню. У відповідь на фагоцитоз патогенів або на контакт з розчинними патогенасоційованими молекулами, а також прозапальними цитокінами, у нейтрофілах і макрофагах розвивається система реакцій, яка має загальну назву “дихальний вибух” і в результаті якої утворюється моновалентна похідна молекулярного кисню — супероксиданіон. Наслідком наступних реакцій є поява інших токсичних метаболітів, таких як пероксид водню, гіпохлориста кислота (НОСІ), гідроксилрадикал та синглетний кисень [7, 8].

Зважаючи на те що пептидоглікан (муреїн) (ПГ) є універсальним і невід’ємним компонентом клітинної стінки практично всіх грампозитивних і грамнегативних бактерій [9, 10], а також беручи до уваги той факт, що ПГ різних видів мікроорганізмів відрізняються за амінокислотним складом пептидних компонентів, ми ставили собі за мету дослідити модуляторний та комодуляторний вплив пептидоглікану *Staphylococcus aureus* Wood 46 на цитотоксичну активність макрофагів мишей і нейтрофілів периферійної крові людей.

Макрофаги виділяли з перитонеальної порожнини мишей лінії С-57/ Black. Нейтрофіли виділяли за методом Р. Madyasta зі співавт. [11] з крові здорових донорів шляхом центрифугування в ступінчастому градієнті фікол-верографіну. Чистоту популяції контролювали шляхом світлової мікроскопії, а також методом проточної цитофотометрії. Вміст нейтрофілів у збагаченій суспензії становив 85%. Бактеріальний ПГ отримували з клітин *Staphylococcus aureus* Wood 46 з колекції культур мікроорганізмів кафедри мікробіології та загальної імунології [12]. У досліджах використовували розчин ПГ у трьох концентраціях: 10 мкг/мл, 100 мкг/мл та 250 мкг/мл. Фагоцитарну активність визначали за відновленням нітросинього тетразолію (НСТ-тест) згідно з методикою F. Muller зі співавт. [13]. Для стимуляції “кисневого вибуху” використовували розчин тетрафорболацетату (ТРА) (“Sigma-Aldrich”, США).

Згідно з результатами дослідження, додавання ПГ у концентрації 10 та 100 мкг/мл достовірно не впливало на киснезалежний метаболізм перитонеальних макрофагів (рис. 1), тоді як у концентрації 250 мкг/мл — підвищувало цитотоксичну активність більше ніж

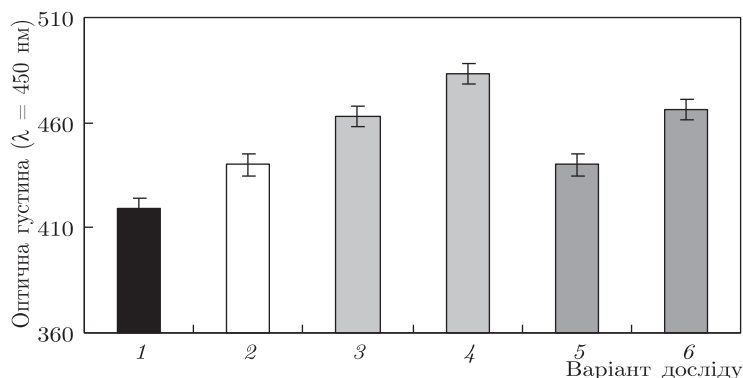


Рис. 2. Вплив пептидоглікану на цитотоксичну активність нейтрофілів людини. Варіант досліджу: 1 — спонтанний контроль; 2 — стимульований контроль; 3 — ПГ в концентрації 10 мкг/мл; 4 — ТРА + ПГ в концентрації 10 мкг/мл; 5 — ПГ в концентрації 250 мкг/мл; 6 — ТРА + ПГ в концентрації 250 мкг/мл

в три рази. ПГ у поєднанні з класичним активатором киснезалежного метаболізму — ТРА чинив дозозалежний вплив на цитотоксичну активність (див. рис. 1). При додаванні ПГ у концентрації 100 та 250 мкг/мл стимулююча дія ТРА підвищувалась на 35%, тоді як при додаванні ПГ у концентрації 10 мкг/мл — знижувалась в 1,5 рази порівняно зі стимульованим контролем (використання ТРА).

Реакція нейтрофілів на ПГ відрізнялась від такої у макрофагів (рис. 2). Максимально ефективним для активації як спонтанного, так і стимульованого “кисневого вибуху” виявився ПГ у концентрації 10 мкг/мл. Підвищення концентрації ПГ призводило до гальмування ефекту активації. Додавання ПГ у концентрації 10 мкг/мл посилювало стимулюючу дію ТРА на 9%.

Таким чином, ПГ *Staphylococcus aureus* Wood 46 посилював як спонтанну, так і стимульовану цитотоксичну активність досліджуваних субпопуляцій фагоцитів. Характер стимульованого впливу на клітини різних фенотипів відрізнявся. Вплив ПГ на цитотоксичну активність макрофагів не мав дозової залежності, тоді як для нейтрофілів була характерною обернено пропорційна дозова залежність ефекту ПГ. Кількість ПГ, необхідна для стимуляції і костимуляції цитотоксичної активності макрофагів, у десятки разів перевищувала таку для нейтрофілів.

Імовірно, різниця в ступені чутливості різних типів фагоцитуючих клітин до дії бактеріального ПГ обумовлена їх структурно-функціональними особливостями.

1. Naldini A., Carraro F. Role of inflammatory mediators in angiogenesis // *Curr. Drug Targets Inflamm. Allergy*. – 2005. – 4, No 1. – P. 3–8.
2. Engwerda C. R., Kaye P. M. Organ-specific immune responses associated with infectious disease // *Immunol. Today*. – 2000. – 21, No 2. – P. 73–78.
3. Pes K. E., Forman H. J. Macrophage signaling and respiratory burst // *Immunol. Res.* – 2002. – 26, No 1–3. – P. 95–105.
4. *Імунологія* / За ред. А. Ю. Вершигори та ін. – Київ: Вища шк., 2005. – 599 с.
5. Tan B. H., Meincen C., Bastian M. et al. Macrophages acquire neutrophil granules for antimicrobial activity against intracellular pathogens // *J. Immunol.* – 2006. – 177. – P. 1864–1871.
6. Clark R. A. Activation of the neutrophil respiratory burst oxidase // *J. Infect. Diseases*. – 1999. – 179. – P. 309–317.
7. Moilanen E., Vapaatalo H. Nitric oxide in inflammation and immune response // *Ann. Med.* – 1995. – 27, No 3. – P. 359–367.

8. *Forman H. J., Torres M.* Signaling by the respiratory burst in macrophages // IUBMB Life. – 2001. – **51**, No 6. – P. 365–371.
9. *Mengin-Lecreulx D., Lemaitre B.* Structure and metabolism of peptidoglycan and molecular requirements allowing its detection by the *Drosophila* innate immune system // J. Endotoxin. Res. – 2005. – **11**, No 2. – P. 105–111.
10. *Boneca I. G.* The role of peptidoglycan in pathogenesis // Curr. Opin. Microbiol. – 2005. – **8**, No 1. – P. 46–53.
11. *Madyastha Prema, Madyastha K. R., Wade T.* An improved method for rapid layering of ficoll-hypaque double density gradients suitable for granulocyte separation // J. Immunol. Methods. – 1982. – **48**. – P. 281–286.
12. *Позур В. К., Михальський Л. А.* Исследования гетерогенности пептидогликанов бактериального происхождения методом электрофореза // Укр. биохим. журн. – 1995. – **67**, № 1. – С. 96–100.
13. *Muller F., Rollang H.* Nitroblue tetrazolium reduction in monocytes and macrophages // APMIS. – 1989. – **76**. – P. 490–496.

*Київський національний університет
ім. Тараса Шевченка
Інститут експериментальної патології,
онкології та радіобіології ім. Р. Є. Кавецького
НАН України, Київ*

Надійшло до редакції 17.07.2007