

Влияние комплексных бактериальных препаратов на оксидантные функции полиморфно-ядерных лейкоцитов крови доноров

Е.А.Усанова¹, С.В.Чаусова¹, О.Ю.Филатов², О.В.Красюк², Б.А.Ефимов³, Ю.В.Балякин¹

¹Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И.Пирогова, кафедра общей патологии медико-биологического факультета, Москва (зав. кафедрой — проф. Ю.В.Балякин);

²Московский государственный медико-стоматологический университет, кафедра патофизиологии лечебного факультета, Москва (зав. кафедрой — проф. И.Ю.Малышев);

³Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И.Пирогова, кафедра микробиологии и вирусологии педиатрического факультета, Москва (зав. кафедрой — проф. Л.И.Кафарская)

В статье оценивали праймирующее действие комплексных препаратов антигенов *Staphylococcus aureus* и *Klebsiella pneumoniae* на полиморфно-ядерные лейкоциты по изменению люминол- и люцигенинзависимой хемилюминесценции крови доноров. Было показано, что бактериальные антигены обоих микроорганизмов стимулируют оксидантные функции лейкоцитов.

Ключевые слова: полиморфно-ядерные лейкоциты, хемилюминесценция, прайминг, бактериальные антигены

The influence of complex bacterial preparations on oxidant functions of polymorphonuclear leukocytes of donors' blood

E.A.Usanova¹, S.V.Chausova¹, O.Yu.Filatov², O.V.Krasyuk², B.A.Efimov³, Yu.V.Balyakin¹

¹The Russian National Research Medical University, Department of General Pathology of Medical-Biological Faculty, Moscow (Head of the Department — Prof. Yu.V.Balyakin);

²Moscow State Medical and Dental University, Department of Pathophysiology of Medical Faculty, Moscow (Head of the Department — Prof. I.Yu.Malyshev);

³The Russian National Research Medical University, Department of Microbiology and Virusology of Pediatric Faculty, Moscow (Head of the Department — Prof. L.I.Kafarskaya)

In this article there was estimated a priming effect of *Staphylococcus aureus* and *Klebsiella pneumoniae* at the polymorphonuclear leukocytes by measuring luminal- and lucigenin amplified chemiluminescence of donors' blood. It was shown that bacterial antigens of both microorganisms stimulated oxidant functions of leukocytes.

Key words: polymorphonuclear leukocytes, chemiluminescence, priming, bacterial antigens

В настоящее время прайминг, или предстимуляция, рассматривается как один из возможных вариантов регуляции оксидантных функций полиморфно-ядерных лейкоцитов (ПМЛ). Суть данного эффекта состоит в том, что действие праймирующего стимула на клетку не приводит к ее непосредственной активации, а вызывает развитие повышенной функциональ-

ной готовности клетки, что, в свою очередь, влечет за собой усиление интенсивности ответа на последующее добавление этого же или другого стимулятора [1–3]. На сегодняшний день известно много праймирующих агентов: различные физические факторы, химические вещества, препараты цитокинов, миелопептиды, микроорганизмы и их компоненты [3–5]. В ряде работ исследовали праймирующее действие бактерий или их антигенов на фагоцитарную активность ПМЛ крови *in vitro* при различных инфекционных заболеваниях и у здоровых людей [6]. Однако чаще всего это было воздействие каким-то одним выделенным компонентом бактерий, являющимся патоген-ассоциированным молекулярным паттерном

Для корреспонденции:

Усанова Елена Алексеевна, ассистент кафедры общей патологии медико-биологического факультета Российского национального исследовательского медицинского университета им. Н.И.Пирогова
Адрес: 117997, Москва, ул. Островитянова, 1
Телефон: (495) 434-8764
E-mail: usanova.alena@bk.ru

Статья поступила 06.12.2011, принята к печати 19.09.2012

данного микроорганизма, — липополисахаридами, пептидогликанами либо выделенными ими токсинами [7, 8]. В организме же при воспалении бактерии пускают в ход все свои факторы патогенности, инвазии, токсины, выделяют продукты жизнедеятельности. Именно поэтому в данной работе была смоделирована *in vitro* ситуация, схожая с той, которая создается в крови здорового человека (*in vivo*) при попадании микроорганизма и возникновении воспалительного процесса. Для этого в качестве праймирующего стимула использовали комплексные бактериальные препараты, состоящие из инактивированных цельных микроорганизмов, их разрушенных компонентов, обладающих антигенными свойствами, и выделенных ими продуктов жизнедеятельности. Как известно, *Staphylococcus aureus* — наиболее частый возбудитель пиогенных инфекций кожи; этот микроорганизм может вызывать поражения внутренних органов, осложняя течение многих воспалительных заболеваний, возбудителем которых не является, приводить к генерализации воспалительного процесса вплоть до развития сепсиса. *Klebsiella pneumoniae* — частый возбудитель воспалительных заболеваний внутренних органов (пневмоний, бронхитов, пиелонефритов); этот микроорганизм способствует развитию гнойных осложнений при различных деструктивных процессах в брюшной полости, например при панкреатитах, холециститах.

В свете всего сказанного целью исследования было изучение праймирующего действия комплекса антигенов *Staphylococcus aureus* и *Klebsiella pneumoniae* на ПМЛ периферической крови здоровых доноров.

Материалы и методы

Для исследования использовали венозную кровь 19 практически здоровых лиц в возрасте от 22 до 40 лет, не болевших острыми воспалительными заболеваниями в течение 3 нед до срока проведения испытания. Кровь забирали с помощью венепункции утром натощак. В качестве антикоагулянта применяли гепарин (50 ЕД/мл). Во взятых образцах крови непосредственно перед проведением исследования производили подсчет лейкоцитарной формулы с определением количества и жизнеспособности ПМЛ.

Препараты бактериальных антигенов получали путем приготовления бактериальных комплексов на целлофановом диске по методу В.Н.Федосеевой и В.А.Камышевой [9]. Полученные маточные суспензии представляли собой комплексные бактериальные препараты, содержащие 10^9 микробных клеток на 1 мл суспензии, фрагменты бактериальных стенок, продукты жизнедеятельности бактерий, антигены, ферменты и токсины данного вида микроорганизма.

Для изучения эффекта прайминга из взятых образцов крови отбирали объемы, содержащие 10^6 ПМЛ, и доводили их до 1 мл раствором Хенкса (рН 7,45). Затем к полученным образцам добавляли 0,01 мл препаратов антигенов *Staphylococcus aureus*

или *Klebsiella pneumoniae* в различных разведениях (от 5×10^6 до 1000×10^6 микробных клеток на 1 мл суспензии). В контрольные пробы вместо препарата антигенов добавляли аналогичный объем физиологического раствора. Все пробы инкубировали в течение 60 мин при 37°C в режиме постоянного перемешивания. Жизнеспособность ПМЛ за время инкубации существенно не изменялась.

После инкубации проводили измерение интенсивности хемилюминесценции (ХЛ) проб на 36-кюветном биохемилюминесцентном анализаторе БЛМ 3606-01 (г. Красноярск), сигнал от которого поступал на персональный компьютер и анализировался с помощью программы VLM-Obrab (г. Красноярск). В качестве активаторов свечения использовали люминол (для регистрации интенсивности ХЛ, отражающей суммарную выработку всех активных форм кислорода) и люцигенин (для регистрации интенсивности ХЛ, отражающей выработку супероксидного анион-радикала O_2^\bullet [10–13]). В кювету хемилюминометра внесли 0,7 мл пробы с ПМЛ, подвергнутыми инкубации с праймирующим агентом, и 0,15 мл активатора (2×10^{-3} М, Sigma, США). После регистрации спонтанной ХЛ добавляли стимулятор клеток — 0,15 мл сульфата бария (2 мг/мл) — и регистрировали стимулированную ХЛ.

С помощью компьютерной программы определяли следующие параметры ХЛ: интенсивность спонтанной ХЛ; интенсивность максимальной ХЛ; время достижения максимальной вспышки ХЛ; интенсивность стимулированной ХЛ, равной разнице между максимальной и спонтанной ХЛ; светосумму ХЛ за период времени достижения максимального свечения. Для оценки эффекта прайминга вычисляли два показателя: индекс прайминга (ИП), равный отношению интенсивности стимулированной ХЛ опытной пробы (праймированной комплексным препаратом антигенов) к интенсивности стимулированной ХЛ контрольной пробы, и показатель отношения светосумм ХЛ опытной и контрольной проб, который обозначали как индекс светосумм (ИС).

Обработку результатов проводили общепринятыми статистическими методами с применением пакета программ «Statistica» (версия 5.0.). Для каждой группы экспериментов вычисляли среднее арифметическое (M), ошибку среднего (m). Для сравнения средних использовали параметрический t -критерий (критерий Стьюдента). На рисунках результаты представлены в виде $M \pm m$. Для оценки связи между ИП и ИС определяли коэффициент корреляции Пирсона (r) и оценивали его достоверность.

Результаты исследования и их обсуждение

На рис. 1 показано влияние препарата антигенов *Staphylococcus aureus* на ИП в зависимости от используемого активатора свечения — люминола или люцигенина. В обоих случаях получена обратная зависимость величины ИП от концентрации антигенов

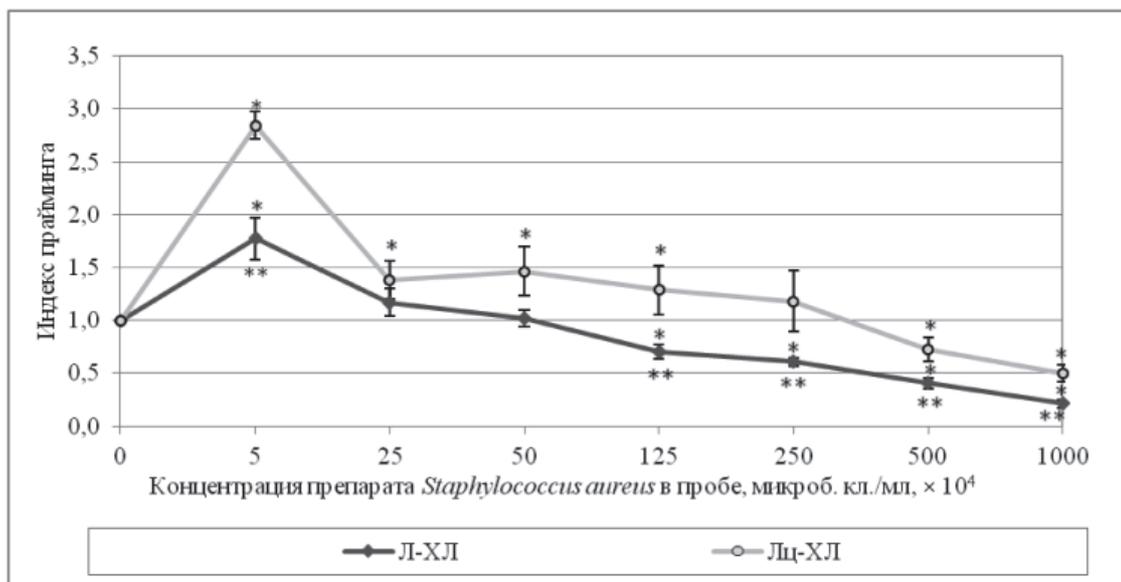


Рис. 1. Влияние комплексного препарата *Staphylococcus aureus* на индекс прайминга ПМЛ, рассчитанный по интенсивности стимулированной хемилюминесценции крови доноров. * — $p < 0,05$ относительно контроля; ** — $p < 0,05$ относительно аналогичной точки на кривой Лц-ХЛ

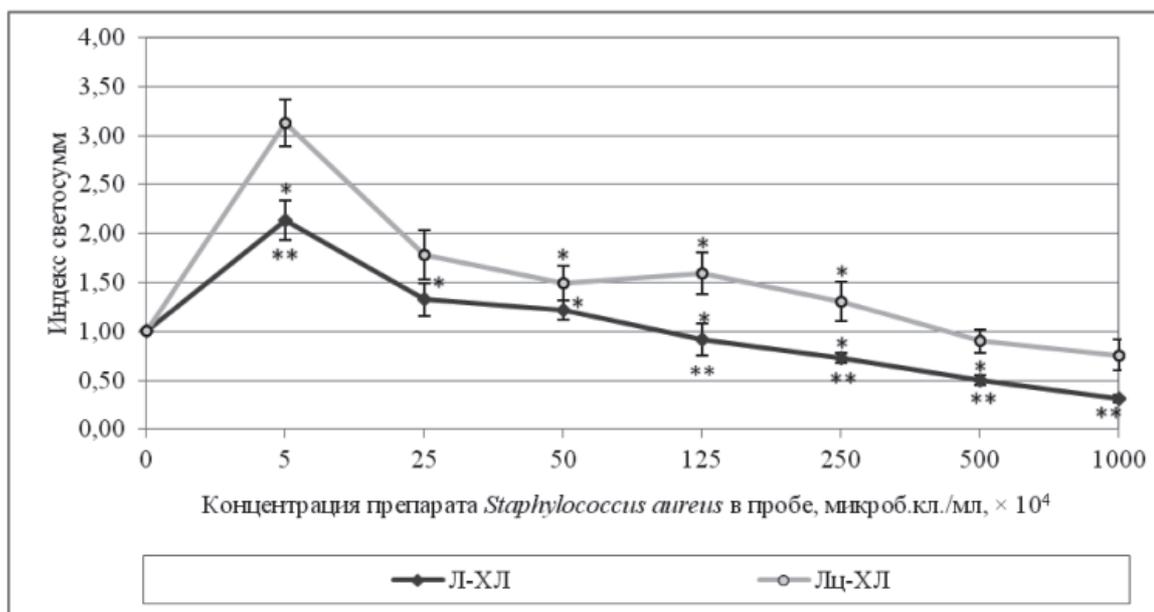


Рис. 2. Влияние комплексного препарата *Staphylococcus aureus* на индекс светосумм ПМЛ. * — $p < 0,05$ относительно контроля; ** — $p < 0,05$ относительно аналогичной точки на кривой Лц-ХЛ

Staphylococcus aureus. При наименьшей исследуемой концентрации — 5×10^4 микробных клеток/мл — был обнаружен наибольший эффект прайминга при регистрации обоих типов свечения: в случае люцигенин-зависимой ХЛ (Лц-ХЛ) ИП составил 2,8, в случае люминолзависимой ХЛ (Л-ХЛ) — 1,8. В диапазоне концентраций 25×10^4 — 125×10^4 микробных клеток/мл стимулирующее влияние препарата на ПМЛ было обнаружено при регистрации Лц-ХЛ, однако при регистрации Л-ХЛ ИП не отличался от контроля. Высокие концентрации препарата антигенов (500×10^4 , 1000×10^4 микробных клеток/мл) вызывали снижение ИП более чем на 50% относительно контроля при

регистрации Л-ХЛ и более чем на 35% при измерении Лц-ХЛ. Для уточнения полученных данных были рассчитаны ИС (рис. 2), а затем определены коэффициенты корреляции между ИП и ИС для обоих типов свечения. Была найдена сильная положительная корреляция между ИП и ИС: в случае использования люминола $r = 0,99$, при использовании люцигенина $r = 0,97$; $p < 0,05$.

Как видно из рис. 1 и 2, при концентрации препарата антигенов *Staphylococcus aureus* 5×10^4 микробных клеток/мл происходит предстимуляция НАДФН-оксидазной и миелопероксидазной реакций кислородозависимого метаболизма ПМЛ. Однако влияние

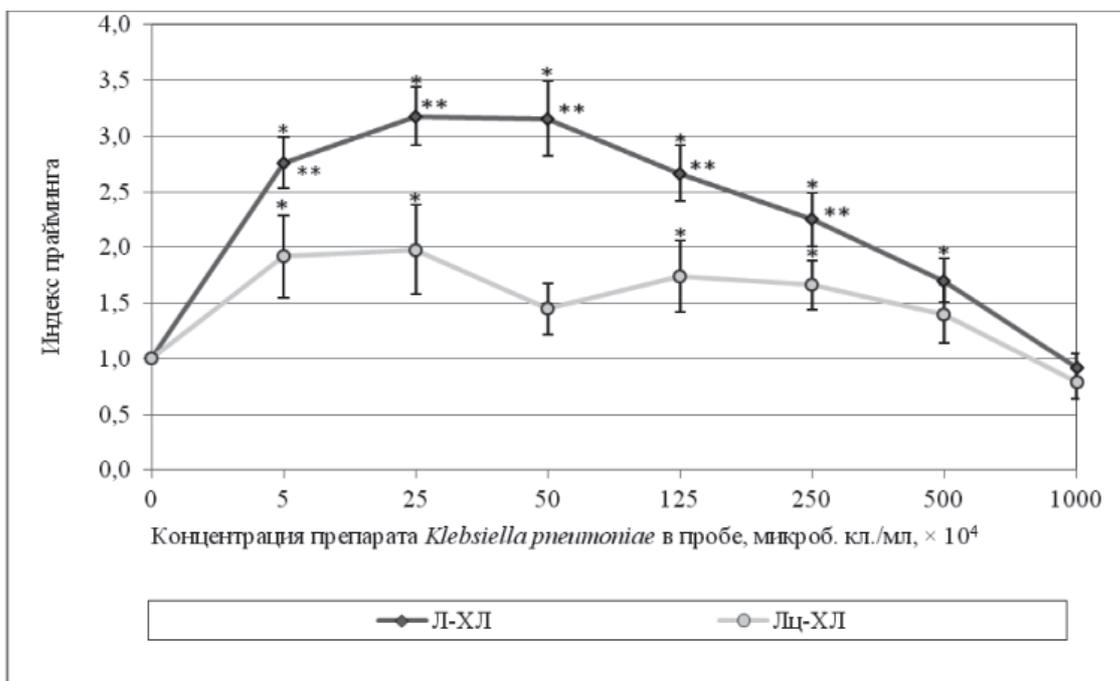


Рис. 3. Влияние комплексного препарата *Klebsiella pneumoniae* на индекс прайминга ПМЛ, рассчитанный по интенсивности стимулированной хемилюминесценции крови доноров. * — $p < 0,05$ относительно контроля; ** — $p < 0,05$ относительно аналогичной точки на кривой Лц-ХЛ

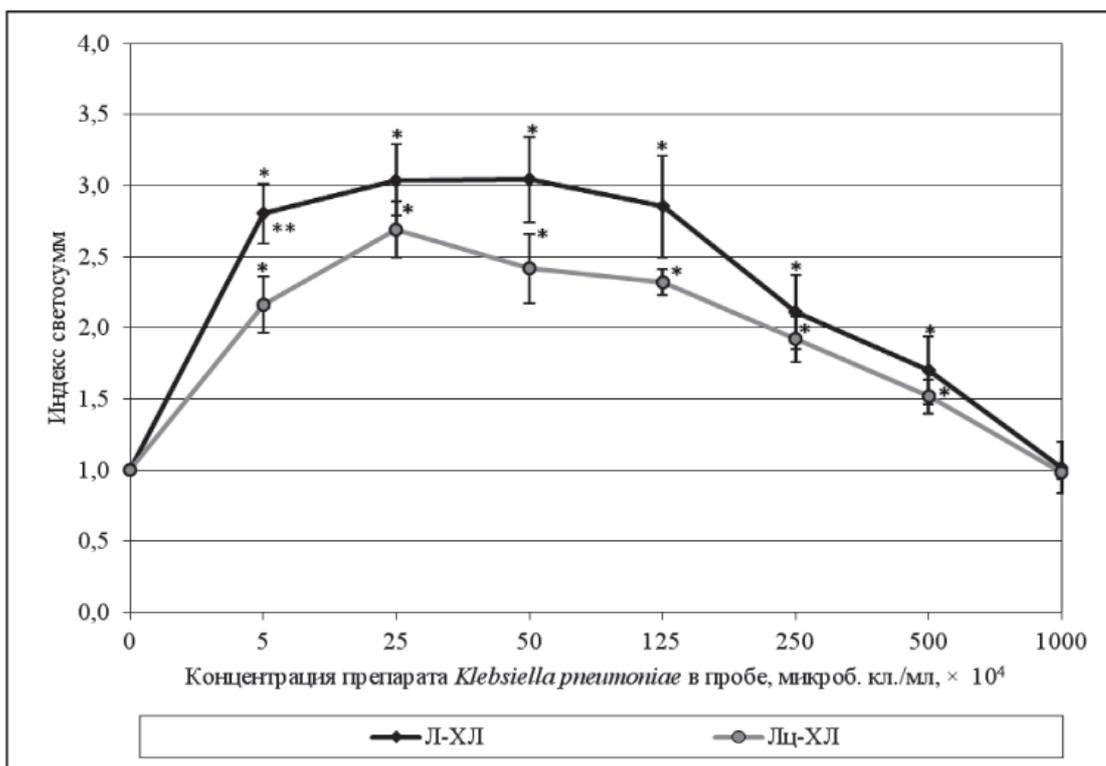


Рис. 4. Влияние комплексного препарата *Klebsiella pneumoniae* на индекс светосумм ПМЛ. * — $p < 0,05$ относительно контроля; ** — $p < 0,05$ относительно аналогичной точки на кривой Лц-ХЛ

данного препарата на активность НАДФН-оксидазы выражено в большей степени. Угнетение Л-ХЛ и Лц-ХЛ под действием высоких концентраций препарата *Staphylococcus aureus* можно объяснить тем, что за время инкубации часть лейкоцитов, присутствующих в пробе, уже активируется и расходует свой

функциональный потенциал к моменту добавления сульфата бария.

На рис. 3 представлено влияние препарата антигенов *Klebsiella pneumoniae* на ИП ПМЛ крови доноров. Эффект прайминга наблюдали при использовании обоих активаторов свечения в широком диапазоне

концентраций препарата (от 5×10^4 до 500×10^4 микробных клеток/мл). Праймирующий эффект отсутствовал только при самой высокой концентрации препарата антигенов (1000×10^4 микробных клеток/мл). Были также рассчитаны ИС (рис. 4) и определены коэффициенты корреляции между ИП и ИС для обоих типов свечения. Была найдена положительная корреляция между ИП и ИС: в случае использования люминола $r = 0,99$, при использовании люцигенина $r = 0,85$; $p < 0,05$.

На основании полученных данных можно утверждать о предстимулирующем влиянии препарата *Klebsiella pneumoniae* на работу как миелопероксидазы, так и НАДФН-оксидазы, причем предстимуляция миелопероксидазы более выражена. Это подтверждают данные литературы о том, что липополисахарид *Klebsiella pneumoniae* стимулирует работу миелопероксидазы лейкоцитов [14].

Проведенные исследования показали, что использованные препараты бактериальных антигенов *Staphylococcus aureus* и *Klebsiella pneumoniae* оказывают праймирующее влияние на кислородозависимый метаболизм ПМЛ. Можно предположить, что прайминг ПМЛ запускается посредством контакта патоген-ассоциированных молекулярных паттернов (РАМР) микроорганизмов с соответствующими им рецепторами лейкоцитов (Toll-like receptors), в результате чего реализуются процессы, ведущие к увеличению функционального потенциала ПМЛ. Полученные нами данные также показывают, что препараты антигенов этих двух видов микроорганизмов по-разному влияют на ферментные системы окислительного метаболизма ПМЛ крови. Возможно, это влияние обусловлено различными механизмами прайминга клеток. По меньшей мере, можно связать разницу в характере синтеза активных форм кислорода ПМЛ с активацией разных типов рецепторов, например с активацией TLR2, распознающих пептидогликаны *Staphylococcus aureus*, и TLR4, связывающих липополисахарид *Klebsiella pneumoniae*.

Выводы

1. При воздействии антигенов *Staphylococcus aureus* или *Klebsiella pneumoniae* выявлено их дозозависимое влияние на стимулированную хемилюминесценцию крови доноров.

2. Эффект прайминга ПМЛ обнаружен при воздействии комплексов антигенов обоих микроорганизмов.

3. Во время прайминга при воздействии препаратов антигенов *Staphylococcus aureus* или *Klebsiella pneumoniae* в ПМЛ подготавливаются условия для последующей более выраженной активации их ферментных систем окислительного метаболизма.

Литература

1. Маянский А.Н. НАДФН-оксидаза нейтрофилов: активация и регуляция // Цитокины и воспаление. 2007. Т.6. №3. С.3–13.
2. Клебанов Г.И., Владимиров Ю.А. Клеточные механизмы прайминга и активация фагоцитов // Успехи соврем. биол. 1999. Т.119. №5. С. 462–475.

3. Тутелян А.В., Клебанов Г.И. Прайминг фагоцитов и его применение в системе оценки специфической активности иммунорегуляторных соединений // Иммунология. 2004. Т.25. №1. С.14–16.
4. Горудко И.В., Вахрушева Т.В., Мухортова А.В. и др. Праймирующее влияние галогенированных фосфолипидов на функциональные ответы нейтрофилов человека // Биол. мембраны. 2010. Т.27. №4. С. 314–324.
5. Нестерова И.В., Швыдченко И.Н. Влияние миелопептидов на функционирование нейтрофильных гранулоцитов // Аллергол. и иммунол. 2005. Т.6. №1. С.70–80.
6. Грачева Т.А. Способ диагностики специфической сенсибилизации организма человека к бактериальным антигенам по показателям хемилюминесцентного свечения нейтрофилов // Иммунология. 2007. Т.28. №5. С.297–299.
7. Marsha A. Protein A activates membrane bound multicomponents enzyme complex NADPH-oxidase in human neutrophils // Immunopharm. and Immunotox. 1999. V.21. №4. P.683–694.
8. Ruchaud-Sparagano M.-H., Ruivenkamp C.A. et al. Differential effects of bacterial lipopolysaccharides upon neutrophil function // FEBS Lett. 1998. V.430. №3. P.363–369.
9. Федосеева В.Н., Камышева В.А. Способ получения бактериальных антигенов. Патент № 2183970. Рег. Гос. реестр изобретений РФ 27.06.2002. Заявка № 2001102725 от 31.01.2001.
10. McPhail L., Clayton C.C. Role NADPH-oxidase of human polymorphonuclear leukocytes // J. Biol. Chem. 1984. V.72. №1. P.192–197.
11. Morel F., Doussier J., Vignais P.V. The superoxide-generating oxidase in phagocytic cells. Physiologic, molecular and pathological aspects // Eur. J. Biochem. 1991. V.202. №3. P.523–546.
12. Грачева Т.А. Совершенствование хемилюминесцентного метода исследования функциональной активности фагоцитирующих клеток // Клини. лаб. диагностика. 2008. №2. С.54–55.
13. Зенков Н.К. Практические замечания по регистрации хемилюминесценции фагоцитирующих клеток // Бюл. СО АМН СССР. 1990. №2. С.72–77.
14. Umeh O., Berkowitz L. Klebsiella infections [Electronic resource] // Medscape Reference [Official website]. Aug 31, 2011. URL: <http://emedicine.medscape.com/article/219907-overview#a0104> (accessed: 05.12.2011).

Информация об авторах:

Чаусова Светлана Витальевна, кандидат медицинских наук, доцент кафедры общей патологии медико-биологического факультета Российского национального исследовательского медицинского университета им. Н.И.Пирогова
Адрес: 117997, Москва, ул. Островитянова, 1
Телефон: (495) 434-8764
E-mail: svetlana_chau@mail.ru

Филатов Олег Юрьевич, доктор медицинских наук, профессор кафедры патофизиологии лечебного факультета Московского государственного медико-стоматологического университета
Адрес: 105275, Москва, ул. Бориса Жигуленкова, 23/1
Телефон: (495) 365-0325
E-mail: helge@bk.ru

Красюк Ольга Владимировна, ассистент кафедры патофизиологии лечебного факультета Московского государственного медико-стоматологического университета
Адрес: 105275, Москва, ул. Бориса Жигуленкова, 23/1
Телефон: (495) 365-0525
E-mail: iybolit@rambler.ru

Ефимов Борис Алексеевич, доктор медицинских наук, профессор кафедры микробиологии и вирусологии педиатрического факультета Российского национального исследовательского медицинского университета им. Н.И.Пирогова
Адрес: 117997, Москва, ул. Островитянова, 1
Телефон: (495) 434-1774
E-mail: efimov_ba@mail.ru

Балякин Юрий Викторович, доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой общей патологии медико-биологического факультета Российского национального исследовательского медицинского университета им. Н.И.Пирогова
Адрес: 117997, Москва, ул. Островитянова, 1
Телефон: (495) 434-3521
E-mail: dekmfbf@rsmu.ru