

ISSN 2304-9081

Учредители:
Уральское отделение РАН
Оренбургский научный центр УрО РАН

Бюллетень
Оренбургского научного центра
УрО РАН
(электронный журнал)



2013 * № 1

On-line версия журнала на сайте
<http://www.elmag.uran.ru>

© Е.А. Щуплова, С.Б. Фадеев, 2013

УДК 576.8.097.29; 616.988.76

Е.А. Щуплова, С.Б. Фадеев

ВЛИЯНИЯ СТАФИЛОКОККОВ С РАЗНЫМ УРОВНЕМ ФАКТОРОВ ПАТОГЕННОСТИ НА ФЕРМЕНТЫ АНТИОКИСЛИТЕЛЬНОЙ ЗАЩИТЫ ЭРИТРОЦИТОВ

Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза УрО РАН, г. Оренбург, Россия

Цель. Изучить действие факторов патогенности *Staphylococcus epidermidis* на антиоксидантную систему эритроцитов (супероксиддисмутаза и каталаза).

Материал и методы. Для изучения изменений ферментных свойств эритроцитов (супероксиддисмутаза, каталаза) воспроизвели генерализованную экспериментальную инфекцию на 72 беспородных мышах с использованием клонов *S. epidermidis*, обладающих гемолитической (ГА) и антигемоглобиновой (АнтиНбА) активностями, которые определяли оригинальными фотометрическими методами. Активность супероксиддисмутаза (СОД) и каталазы эритроцитов определяли стандартными способами, уровень гемоглобина в крови у мышей - гемиглобинцианидным методом.

Результаты. Результаты исследований показали, что под действием клонов *S. epidermidis* с высокой ГА или АнтиНбА происходила разнонаправленная модификация рассматриваемых компонентов антиоксидантной системы – повышение СОД и снижение каталазы. Реализация антибактериальной активности эритроцитов снижалась в отношении клонов с высокой АнтиНбА. Снижение уровня гемоглобина у экспериментальных животных было связано с высоким уровнем ГА стафилококков и, в большей степени, с высокой АнтиНбА микроорганизмов.

Заключение. Полученные результаты раскрывают первые этапы взаимодействия микроорганизмов с эритроцитами – нарушение ферментов антиоксидантной защиты и снижение уровня гемоглобина. Результаты данной работы открывают новые подходы в расшифровке патогенеза генерализованных форм инфекций.

Ключевые слова: эритроциты, гемоглобин, бактерии, каталаза, супероксиддисмутаза.

Е.А. Shchuplova, S.B. Fadeev

EFFECT OF STAPHYLOCOCCI WITH DIFFERENT LEVELS OF PATHOGENICITY FACTORS ON RED BLOOD CELLS ANTIOXIDANT PROTECTION ENZYMES

Institute of Cellular and Intracellular Symbiosis UrB RAS, Orenburg, Russia

Aim. Study the effect of of pathogenicity factors of *Staphylococcus epidermidis* on the anti-oxidant system of red blood cells (superoxide dismutase and catalase).

Materials and methods. To study changes in erythrocyte enzyme (superoxide dismutase, catalase) reproduced the experimental generalized infection on 72 outbred mice using clones of *S. epidermidis*, with hemolytic (HA) and anti-hemoglobin (AntiHbA) activity, which defined the original photometric methods. Superoxide dismutase (SOD) and catalase red blood cells were determined by standard methods, the level of hemoglobin in the blood-on mice - gemiglobin-cyanide method.

Results. Research has shown that the action of clones of *S. epidermidis* high HA or AntiHbA the volatile modification of antioxidant system of red blood cells were occurs - increase of SOD and reduce of catalase. The implementation of the antibacterial activity red blood cells decreased against clones of with high AntiHbA. Reduction of hemoglobin in experimental animals has been associated with high levels of HA of staphylococci and, to a greater degree, with high AntiHba of microbes.

Conclusion. These results reveal the first stages of the interaction of microorganisms with red blood cells - a violation of antioxidant protection enzymes and reduced hemoglobin levels. The results of this work opens up new approaches to the study of the pathogenesis of generalized forms of infections.

Key words: erythrocytes, hemoglobin, bacterias, catalasa, superoxide dismutase.

Введение.

При инфекционном процессе между организмом и бактериями происходит конкурентная борьба за железо, являющееся важным компонентом биохимических процессов, обеспечивающих рост, размножение бактериальных клеток и образование факторов патогенности [10]. Известно, что железо в организме человека находится в связанном состоянии с белками – трансферрин (Тф), лактоферрин (Лф), и в форме гемсоединений – гемоглобин, миоглобин [2]. Гемоглобин эритроцитов представляет собой гетерогенную систему, которая может меняться под воздействием различных экзогенных и эндогенных факторов. Для защиты эритроцита и его систем от указанных факторов существует комплекс разнообразных протективных механизмов. Супероксиддисмутаза (СОД) и каталаза являются внутриклеточными антиоксидантами и играют важную роль в защите гемоглобина и мембраны эритроцита от повреждающего действия активных форм кислорода (АФК) [9]. Изменения, приводящие к нарушению антиокислительной защиты эритроцитов и снижению уровня гемоглобина, способствуют развитию тканевой гипоксии и связанных с ней клеточных повреждений [8]. Особенности влияния стафилококков на ферменты антиокислительной защиты (СОД и каталаза) и систему гемоглобина изучены недостаточно.

В этой связи целью работы явилось изучение действия факторов патогенности *S. epidermidis* на антиоксидантную систему эритроцитов (СОД, каталаза).

Материалы и методы.

Для изучения изменений ферментных свойств эритроцитов (СОД, каталаза) воспроизвели экспериментальную инфекцию на животных с использованием штаммов рода *Staphylococcus*, обладающих гемолитической и антигемоглобиновой активностями, мишенью которых являются эритроциты. Гемолитиче-

скую (ГА) и антигемоглобиновую (АнтиНбА) активности у микроорганизмов определяли фотометрическими методами [1, 3].

Для моделирования генерализованной стафилококковой инфекции использовали внутривенный метод заражения животных (мыши). Инфицирование проводили 0,1 мл взвеси суточной агаровой культуры бактерий в концентрации 50-85 млн. микробных клеток/мл. Содержание животных, экспериментальные вмешательства осуществляли согласно приказу МЗ СССР №775 от 12.08.1977 г. «О мерах по дальнейшему совершенствованию организационных форм работы с использованием экспериментальных животных».

Для заражения использовали штамм *S. epidermidis*, выделенный из клинического материала. Для получения изогенных клонов применяли метод популяционного анализа, данные клоны отличались между собой по уровню экспрессии двух признаков: гемолитической (ГА) и антигемоглобиновой (АнтиНбА) активности. На протяжении 10 серий опытов изучаемые свойства у полученных клонов оставались стабильными. Среди 23 клонов *S. epidermidis* было отобрано 3 клон с разным уровнем экспрессии изучаемых свойств. I группу мышей заражали клоном №7, который характеризовался низким уровнем ГА (27,1% гемолиза) и высоким уровнем АнтиНбА (5,8 г/л); II группу – клоном №13 с высоким уровнем ГА (54,4% гемолиза) и низким уровнем АнтиНбА (0,4 г/л); III группу клоном №1, отличавшимся низким уровнем как ГА (35,1% гемолиза), так и АнтиНбА (1,9 г/л). В каждой группе животных было по 18 мышей, исследования проводили в трех параллелях. В качестве контроля использовались эритроциты 18 здоровых мышей.

Активность супероксиддисмутазы и каталазы определяли по известным методикам [4]. Уровень гемоглобина в крови у мышей определяли гемиглобинцианидным методом [5] с помощью спектрофотометра Genesys 5 (США) [4].

Полученные результаты были подвергнуты статистической обработке с помощью Microsoft Office Excel 2007 с вычислением средней арифметической (M); средней ошибки (m); критерия значимости (t) Стьюдента. Различия считались значимыми (достоверными) при $p < 0,05$ [6].

Результаты.

Действие клонов *S. epidermidis* на активность СОД существенно зависело от факторов патогенности бактерий (рис. 1).

Под действием клонов с высоким уровнем АнтиНбА и низким уровнем

ГА (I группа опытных животных), в отличие от всех других групп, наблюдали самые высокие показатели СОД, что составляло $519,1 \pm 10,4$ усл.ед/гНб против $287,9 \pm 96,4$ усл.ед/гНб (II группа мышей) и $251,6 \pm 10,8$ усл.ед/г Нб контрольных значений соответственно (при $p < 0,05$). Влияние клонов с низкими значениями ГА и АнтиНбА сводилось к понижению активности СОД.

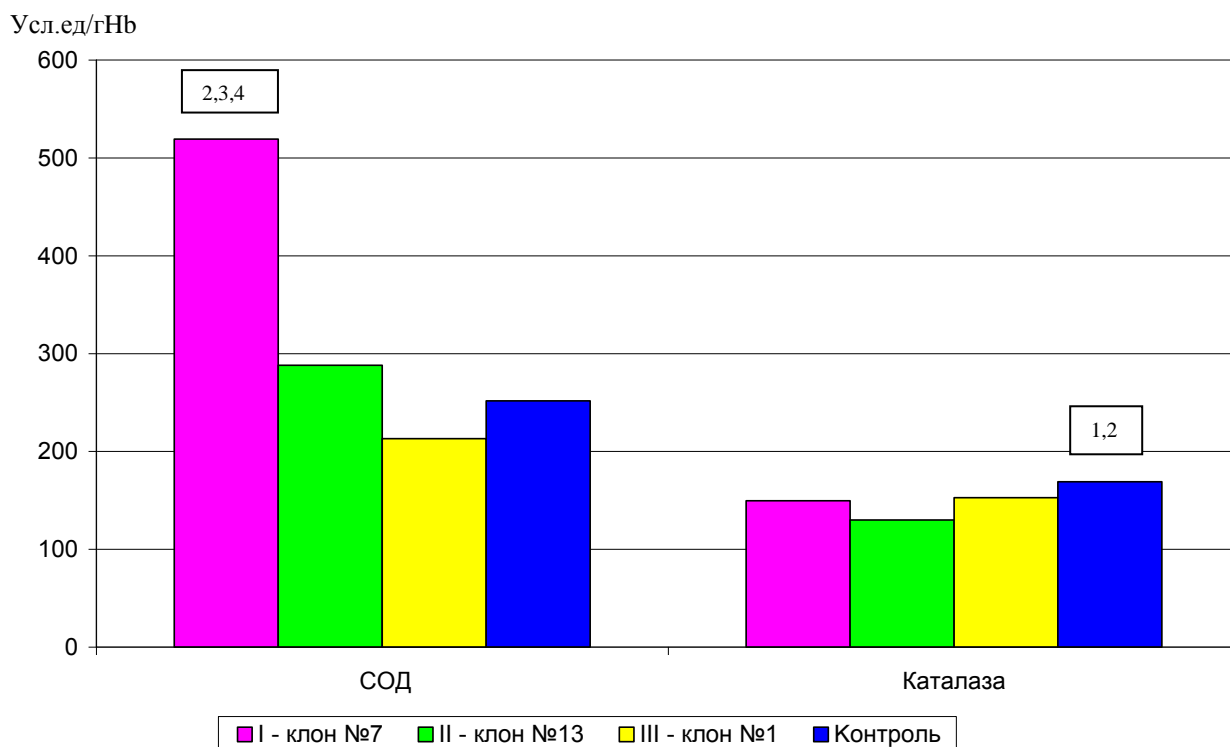


Рис. 1. Изменение антиоксидантных свойств эритроцитов под действием *S. epidermidis* при экспериментальной инфекции.

Примечание: 1, 2, 3, 4 – достоверность отличий при $p < 0,05$.

Повышение активности супероксиддисмутазы, очевидно, происходило в ответ на оксидативный стресс, вызванный инфицированием, что согласуется с данными литературы [8].

Активность каталазы под действием *S. epidermidis* наиболее значимо снижалась у животных I и II групп (рис. 1). Причем во II группе, где мышей заражали клоном с высоким уровнем ГА и низким уровнем АнтиНбА наблюдали самые низкие значения фермента, по сравнению с показателями контрольной группы ($129,9 \pm 11,5$ усл.ед/г Нб против $168,9 \pm 9,3$ усл.ед/г Нб; $p < 0,05$).

Таким образом, под действием клонов *S. epidermidis* с высокой ГА или АнтиНбА происходила разнонаправленная модификация рассматриваемых компонентов антиоксидантной системы – повышение СОД и снижение каталазы эритроцитов.

Одним из механизмов антибактериальной активности эритроцитов является функционирование ферментов антиоксидантной системы (АОС) [9], что диктует необходимость оценки чувствительности клонов *S. epidermidis*, подавляющих в разной степени АОС эритроцитов, к бактерицидному действию последних. Установлено, что по отношению к клонам *S. epidermidis* с низким уровнем АнтиНвА (независимо от уровня ГА) имело место подавление роста и размножения микроорганизмов: в 15-17 случаях из 20 (при $p < 0,05$). Реализация антибактериальной активности эритроцитов снижалась в отношении клонов с высокой АнтиНвА. Полученные результаты коррелируют с ранее опубликованными данными [8].

Исследование уровня гемоглобина в крови у мышей при экспериментальной инфекции показало изменение данного показателя относительно нормальных значений (96 г/л) [7] (рис. 2).

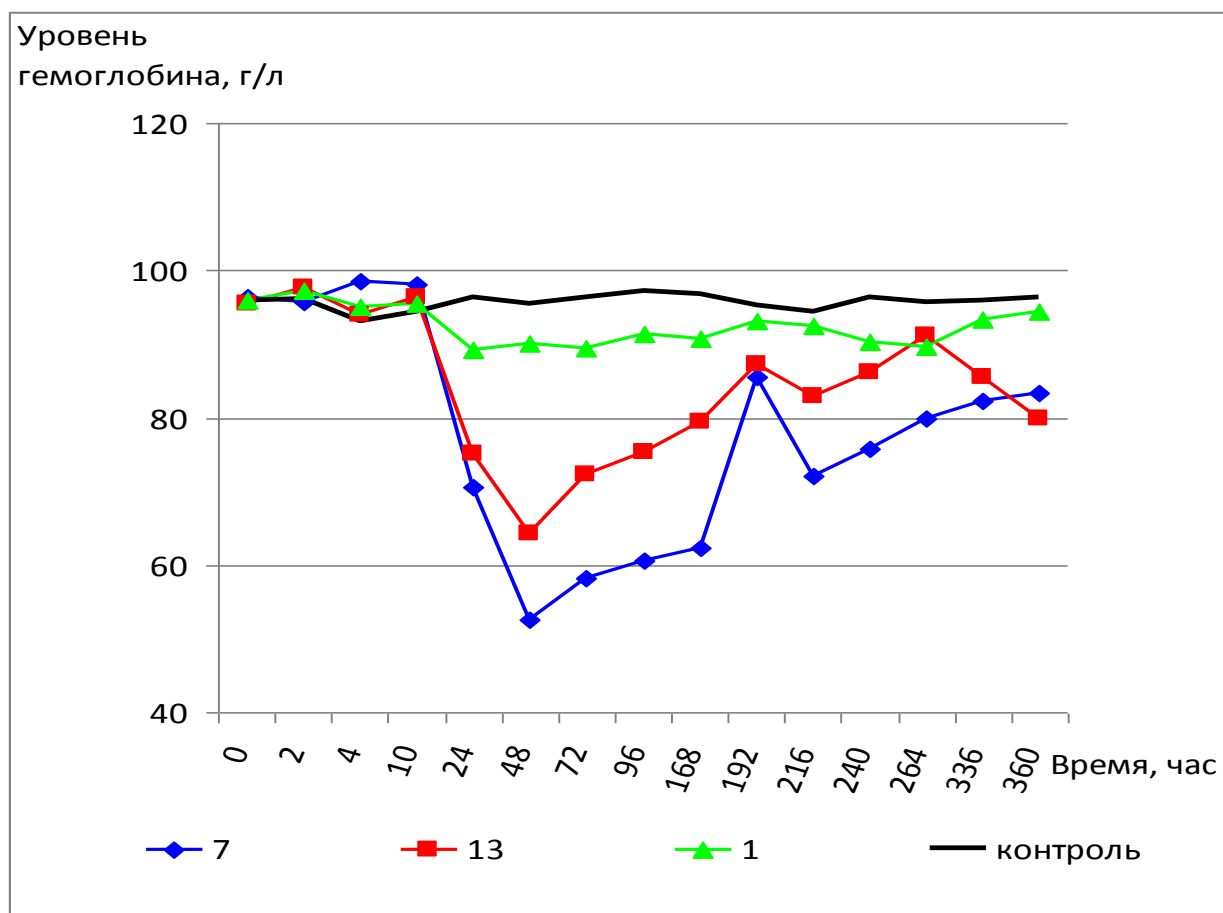


Рис. 2. Изменение уровня гемоглобина крови экспериментальных животных при инфицировании различными клонами.

Примечание: * - достоверность отличий при $p < 0,05$.

В первые часы после заражения у всех мышей наблюдали некоторое повышение уровня гемоглобина: от 96,4 г/л до 98,2±2,2 г/л у мышей, зараженных клоном № 7 (I группа), и от 95,4 г/л до 97,7±2,1 г/л у мышей, зараженных клонами № 13 и № 1 (II и III группы соответственно). Затем в течение 24-168 ч происходило более значительное падение уровня гемоглобина у мышей, зараженных клоном № 7, по сравнению с показателями гемоглобина у мышей, зараженных клоном № 13 (52,5±0,6 г/л против 64,3±1,1 г/л соответственно). Далее на протяжении 5 суток (от 216 до 360 часов) у опытных мышей, зараженных разными клонами, значения уровня гемоглобина оставались ниже нормы. Причем у мышей, зараженных клоном № 7, уровень гемоглобина (на данном промежутке времени) составлял 58,2±0,6 - 85,5±1,6 г/л, тогда как у мышей, зараженных клоном №13, уровень гемоглобина был выше: 72,4±1,3 - 87,2±1,7 г/л. В группе мышей, инфицированных клоном № 1, на протяжении всего эксперимента наблюдали значения уровня гемоглобина, сопоставимые с таковыми в контрольной группе.

Таким образом, снижение уровня гемоглобина у экспериментальных животных было связано с высоким уровнем ГА и, в большей степени, с высокой АнтиНвА микроорганизмов – возбудителей экспериментальной инфекции.

Обсуждение.

Полученные результаты показали, что инфицирование экспериментальных животных эпидермальным стафилококком приводило к заметным изменениям активности СОД эритроцитов, особенно у животных I группы. При действии клонов как с высокой гемолитической, так и с высокой антигемоглобиновой активностями, значения активности супероксиддисмутазы во время эксперимента существенно увеличивались. Возможно, выявленная особенность относится к категории адаптивных защитных реакций эритроцитов при генерализованных инфекциях. Во время эксперимента в I и II опытных группах наблюдали понижение уровня гемоглобина в крови у мышей, что может быть следствием нарушения функционирования антиокислительных ферментов эритроцитов и, следовательно, защиты внутриэритроцитарного гемоглобина. В ходе работы было установлено, что и сами эритроциты обладали антибактериальной активностью в отношении *S. epidermidis*.

В целом полученные результаты раскрывают первые этапы взаимодействия микроорганизмов с эритроцитами – нарушение активности ферментов антиокис-

лительной защиты эритроцитов и снижение уровня гемоглобина. Возможно, это дает возможность бактериям захватывать железо непосредственно из гема и использовать его для собственного бактериального метаболизма. Результаты данной работы открывают новые подходы в расшифровке патогенеза генерализованных форм инфекций.

Авторы выражают благодарность к.б.н. Икрянниковой С.В. и д.м.н., профессору Красикову С.И. (кафедра медицинской и фармацевтической химии ОрГМА) за помощь в проведении исследований.

Литература.

1. Азнабаев Г.К. Некоторые биологические свойства бактерий рода *Citrobacter*, выделенных при моно- и ассоциированных бактериальных инфекциях. Автореф. дис. ... канд. мед. наук.-Оренбург, 2003. 26 с.
2. Бухарин О.В., Усвяцов Б.Я., Ханина Е.А. Взаимодействие бактерий и эритроцитов. Журн. микробиол. 2005. №4: 89-96.
3. Бухарин О.В., Усвяцов Б.Я., Ханина Е.А. Определение антигемоглобиновой активности микроорганизмов. Патент России № 2262705.2005. Бюл. №19.
4. Икрянникова С.В. Влияние экологических факторов на антиоксидантный статус и спектральные характеристики гемоглобина жителей промышленного города: дис...канд.биол.наук. Оренбург. 2006. 119 с.
5. Инструкция по применению набора реагентов для определения гемоглобина в крови гемиглобинцианидным методом. ООО «Агат-Мед»
6. Ланг Т.А., Сесик М. Как описывать статистику в медицине. Аннотированное руководство для авторов, редакторов и рецензентов / Пер. с англ. под ред. В.П. Леонова. М.: Практическая медицина, 2011. 480 с.
7. Сахаров П.П. Лабораторные животные их болезни, некоторые биологические особенности и зоотехнические основы содержания, кормления и разведения. Москва-Ленинград: Гос. изд-во биологической и медицинской литературы, 1937. 278 с.
8. Сторожук П.Г. Ферменты прямой и косвенной антирадикальной защиты эритроцитов и их роль в инициации процессов оксигенации гемоглобина, антибактериальной защите и делении клеток. Вестник интенсивной терапии. 2001. № 3: 8-13.
9. Mandell G.L. Catalase, superoxide dismutase, and virulence of *Staphylococcus aureus*. In vitro and in vivo studies with emphasis on staphylococcal-leukocyte interaction. J. Clin invest., 1975. 55(3): 561-611.
10. Pishchany G., Skaar E. P. Taste for Blood: Hemoglobin as a Nutrient Source for Pathogens. PLoS Pathogens. 2012. Vol. 8: 1-4.

Поступила 30.03.2013

(Контактная информация: Щуплова Елена Алексеевна - к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории экологии микроорганизмов Института клеточного и внутриклеточного симбиоза УрО РАН; 460000, г. Оренбург, ул. Пионерская, 11; тел. 8 (3532) 77-54-17, e-mail: Khanina83@yandex.ru)