

УДК: 576.8.094.4:612.017

Роль *Corynebacterium non diphtheriae* в индукции апоптоза макрофагов мышей

Г.Г. Харсеева, Н.А. Воронина, Э.Л. Алутина, А.Ю. Миронов, Н.И. Мамычева, Н.А. Голованова

Ростовский государственный медицинский университет (РостГМУ), Россия, г.Ростов-на-Дону
Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова, Россия, г. Москва

The role of *Corynebacterium non diphtheriae* in induced apoptosis of mice macrophages

G.G.Kharseeva, N.A.Voronina, E.L.Alutina, A.J.Mironov, N.I.Mamucheva, N.A.Golovanova

Rostov state medical university, Russia, Rostov-on-Don
The first Moscow state medical university by the name of I.M.Sechenov, Russia, Moscow

Аннотация

Целью исследования явилось изучение роли программированной клеточной гибели, индуцированной *Corynebacterium non diphtheriae*, в альтерации перитонеальных макрофагов белых мышей. Исследованы штаммы *Corynebacterium non diphtheriae*, выделенные из верхних дыхательных путей и урогенитального тракта, обладающие апоптогенной активностью в отношении макрофагов белых беспородных мышей. Установлено, что наиболее высокий апоптогенный эффект вызывали штаммы, выделенные из верхних дыхательных путей (96,2±2,7%), по сравнению со штаммами из урогенитального тракта (59,4±7,0%). Показана способность недифтерийных коринебактерий вызывать в разной степени программированную гибель клеток как в монокультуре, так и в ассоциации с другими микроорганизмами: *S.aureus*, *S.pyogenes*, *E.coli* и различными видами недифтерийных коринебактерий. Выявленная способность штаммов *Corynebacterium non diphtheriae* индуцировать программированную клеточную гибель у мышей, по-видимому, связана с механизмами реализации их патогенных свойств.

Ключевые слова

Corynebacterium non diphtheriae, макрофаги, апоптогенный эффект, микробы-ассоцианты.

Недифтерийные коринебактерии (*C.pseudotuberculosis*, *C.pyogenes*, *C.bovis*, *C.equi*, *C.xerosis*, *C.kutscheri* и др.) являются одними из

Summary

The task of our investigation was study the role of programmed cell death induced by *Corynebacterium non diphtheriae* in alteration of white mice macrophages. The apoptogenic action of *Corynebacterium non diphtheriae* stamms which were taken from upper respiratory tract and urogenital tract towards to white mice macrophages was estimated. It was established that the highest apoptogenic effect had stamms taken from upper respiratory tract (96,2 2,7%) in compare with stamms taken from urogenital tract (59,4 7/0%). The ability of *Corynebacterium non diphtheriae* to develop of different degree cell death was shown both as in monoculture and in association with another microorganisms: *S.aureus*, *S.pyogenes*, *E.coli* and another types of *Corynebacterium non diphtheriae*. Revealed ability of *Corynebacterium non diphtheriae* stamms in induce the programmed cell death at mice is probably related with mechanisms of their pathogenic properties realization.

Key words

Corynebacterium non diphtheriae, macrophages, apoptogenic effect, microbes-associants.

главных представителей нормальной микрофлоры кожи и мембраны слизистой оболочки различных биотопов организма человека (1, 2,

3, 4, 5). За последнее десятилетие участились случаи гнойно-септических заболеваний, причиной которых явились *Corynebacterium non diphtheriae* у лиц с вторичными иммунодефицитными состояниями, онкологических, гематологических больных, наркоманов, ВИЧ-инфицированных, пожилых, а также у больных с кардиопатологией после протезирования (6, 7, 8).

Corynebacterium non diphtheriae, продуцируя факторы патогенности, оказывают токсическое воздействие на организм человека, колонизируя мембрану слизистой (9,10). Инвазивная способность нетоксигенных коринебактерий, по-видимому, обусловлена поверхностными антигенами, *corD*-фактором, нейраминидазой и N-ацетилнейраминидазой (4,9). *Corynebacterium non diphtheriae* влияют на иммунокомпетентные клетки организма, снижая фагоцитарную активность (3) и активизируя процессы апоптоза в клетках хозяина (11). Апоптогенная активность коринебактерий как важнейший механизм реализации патогенного действия может служить способом их выживания и распространения в организме (3,11).

Цель работы: изучение роли активной программированной клеточной гибели, индуцированной *Corynebacterium non diphtheriae*, в альтерации перитонеальных макрофагов белых мышей.

Материалы и методы

Исследованы штаммы *S.pseudotuberculosis*, *S.pseudodiphtheriticum*, *S.xerosis*, *S.amyco-latum*, *S.striatum* (79 шт.), выделенные за период с 2009 по 2011г.г из верхних дыхательных путей (зева, носа) от больных острым и хроническим тонзиллитом и урогенитального тракта (влагалище, цервикальный канал, моча) от пациентов с острым кольпитом, острым и хроническим пиелонефритом, беременных, а также лиц, проходивших профилактическое обследование. Штаммы коринебактерий предоставлены бактериологической лабораторией ГУЗ «Областная детская больница» г. Ростова-на-Дону и МУЗ «Горбольница №1» г. Гуково Ростовской области. Штаммы *Corynebacterium non diphtheriae* идентифицировали общепринятыми методами по морфологическим, тинкториальным, культуральным, биохимическим свойствам на питательных средах в соответствии с указаниями Н.Н. Костюковой (12) и с помощью набора для идентификации корине-

формных бактерий «Ари Coryne» («Bio Merieux», Франция).

Исследование апоптогенной активности штаммов *Corynebacterium non diphtheriae* проводили на белых беспородных мышках (18-20г) из питомника ФГУЗ «Ростовский-на-Дону научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора. Умерщвление животных осуществляли методом цервикальной дислокации после предварительной наркотизации с помощью тиопентала натрия в дозе 5 мг/кг. Объектом исследования послужили перитонеальные макрофаги мышей. Клетки выделяли через 4 часа после внутрибрюшинного введения 1% пептонной воды pH 7,2 (2 мл), вызвавшего асептическое воспаление. Макрофаги получали через 4 суток после введения пептона. Взятие клеток проводили промыванием брюшной полости животных средой 199 (10 мл), содержащей 5 ед/мл гепарина, 20% инактивированной при +56° С в течение 30 мин. сыворотки крови человека и пенициллин – 100 ед/мл. Полученный экссудат смешивали со взвешенными культурами *Corynebacterium non diphtheriae* густотой 5 КОЕ (500 млн. м.т/мл) в разведениях 1:10 и 1:100 (0,1 мл) и подслаивали под покровное стекло, вложенное в стерильный пенициллиновый флакон. Флаконы, в которых покровные стекла находились на внутренней верхней стенке, инкубировали при +37° С в течение часа. Контролем явилась культура макрофагов, к которой добавляли растворитель без микробной взвеси. Затем стекла промывали в 6 порциях стерильного раствора Хенкса, переносили в стерильные пенициллиновые флаконы с 2 мл среды 199 с добавлением 20% инактивированной сыворотки и пеницилина - 100 ед/мл и вновь инкубировали при +37° С в течение 5 часов. После инкубации стекла подсушивали, фиксировали 20 минут и окрашивали по Май-Грюнвальду с докрасиванием по Романовскому-Гимзе. Мазки высушивали и с помощью иммерсионного масла и просматривали в микроскопе при увеличении 90x7. В мазках подсчитывали процент клеток с апоптозом. Средний показатель вычисляли по трем экспериментам. При условии обнаружения в контрольных мазках 94±1% жизнеспособных макрофагов подсчитывали процент клеток с апоптозом в опытных образцах. Статистическую обработку результатов проводили с использованием статистических пакетов «Microsoft Office 2007» и «Statistica 6.0» для Windows XP. Достоверность

полученных данных оценивали при уровне значимости $t \geq 2$ ($P \geq 95\%$).

Результаты и обсуждение

Штаммы *Corynebacterium non diphtheriae*, выделенные из верхних дыхательных путей (ВДП) - *C.pseudotuberculosis*, *C.pseudodiphtheriticum*, *C.amycolatum* обнаруживали в количестве - 10^5 и 10^6 ; из урогенитального тракта (УГТ) - *C.pseudotuberculosis*, *C.xerosis*, *C.amycolatum*, *C.striatum* — в количестве III-IV степени, из мочи - 10^5 и 10^6 , что расценивали как диагностически значимый показатель, свидетельствующий об их этиологической роли в генезе заболевания. В ассоциации с условно-патогенными микроорганизмами (УПМ) из ВДП выделены 57% штаммов *Corynebacterium non diphtheriae*, из УГТ - 55% штаммов. Среди микробов-ассоциантов обнаруживали следующих представителей нормальной и условно-патогенной микрофлоры: *S.aureus*, *S.saprophyticus*, *S.epidermidis*, *S.viridians*, *E.faecalis*, *Enterococcus* spp., *E.coli*, *P.mirabilis*, *K.pneumoniae*.

Все штаммы *Corynebacterium non diphtheriae*, выделенные как из ВДП, так и УГТ (табл.1), обладали апоптогенной активностью в отношении макрофагов белых мышей. Причем, апоптогенный эффект *Corynebacterium non diphtheriae* имел дозозависимый характер.

Сравнительный анализ результатов апоптогенной активности штаммов коринебактерий, выделенных из разных биотопов показал, что наиболее высокой активностью ($t \geq 2$) обладали штаммы, выделенные из ВДП ($96,2 \pm 2,7\%$), по сравнению со штаммами, выделенными из УГТ ($59,4 \pm 7,0\%$). При исследовании коринебакте-

рий, выделенных из ВДП установлено, что наиболее выраженным апоптогенным действием ($t \geq 2$) обладали штаммы *C.amycolatum* (100%) и *C.pseudotuberculosis* (100%) по сравнению со штаммом *C.pseudodiphtheriticum* ($88,5 \pm 4,2\%$). Причем, данные штаммы выделены в диагностически значимом количестве в ассоциации с другими микроорганизмами (*S.aureus*, *S.viridians*, *Enterococcus* spp.). Среди *Corynebacterium non diphtheriae*, выделенных из УГТ, наиболее высокой апоптогенной активностью обладали штаммы *C.amycolatum* ($73,0 \pm 7,6\%$) и *C.striatum* ($66,0 \pm 6,4$), обнаруженные в моче и влагалище в ассоциации с *E.coli* и *S.saprophyticus*. При этом апоптогенный эффект был ниже у выделенных в монокультуре из мочи штаммов *C.xerosis* ($45,0 \pm 7,6\%$) и *C.pseudotuberculosis* ($53,5 \pm 6,9\%$).

Учитывая, что *Corynebacterium non diphtheriae*, как правило, выделяют из различных биотопов человеческого организма в ассоциации с другими микробами, было проведено их исследование в сочетании с *S.aureus*, *S.pyogenes*, *E.coli* и различными видами недифтерийных коринебактерий при экспериментальном моделировании развития процесса программированной клеточной гибели у мышей.

Результаты исследований показали, что *C.amycolatum* обладал одинаково высоким апоптогенным действием на макрофаги *in vitro* как в монокультуре, так и в ассоциации с другими недифтерийными коринебактериями. В то же время, наблюдалось снижение ($t \geq 2$) показателей апоптоза, индуцированного *C.amycolatum* в ассоциации со штаммами *S.aureus* ($48,0 \pm 7,1\%$), *S.pyogenes* ($47,0 \pm 7,0\%$) и *E.coli* ($54,5 \pm 6,8\%$).

Таблица 1. Апоптогенный эффект штаммов *Corynebacterium non diphtheriae* в отношении макрофагов мышей

Место выделения (биотоп)	Вид	Количество клеток с апоптозом ($\% \pm m$)		Микробы-ассоцианты
		1:10	1:100	
ВДП	<i>C.amycolatum</i>	100	100	<i>S.aureus</i> , <i>Enterococcus</i> spp.
	<i>C.pseudotuberculosis</i>	100	$88,0 \pm 4,6$	<i>S.aureus</i>
	<i>C.pseudodiphtheriticum</i>	$88,5 \pm 4,2$	$54,5 \pm 6,3$	<i>S.viridians</i>
	Всего	$96,2 \pm 2,7$	$80,8 \pm 5,6$	
УГТ	<i>C.amycolatum</i>	$73,0 \pm 6,0$	$44,0 \pm 6,8$	<i>E.coli</i>
	<i>C.striatum</i>	$66,0 \pm 6,4$	$33,0 \pm 7,0$	<i>S.saprophyticus</i> , <i>E.coli</i>
	<i>C.pseudotuberculosis</i>	$53,5 \pm 6,9$	$21,8 \pm 5,6$	-
	<i>C.xerosis</i>	$45,0 \pm 7,6$	$26,4 \pm 5,9$	-
	Всего	$59,4 \pm 7,0$	$31,3 \pm 6,6$	

У штамма *S.xerosis*, обладавшего низкой апоптогенной активностью ($45 \pm 7,6\%$), в ассоциации с другими бактериями показатели апоптоза ($t \geq 2$) увеличивались: с *S.pyogenes* ($74,5 \pm 6,0\%$), *E.coli* ($68,6 \pm 6,7\%$), *C.pseudotuberculosis* ($73,0 \pm 6,4\%$) и *C.amycolatum* ($77,3 \pm 5,8\%$). Показатели апоптогенной активности в отношении макрофагов мышей у штаммов *C.pseudotuberculosis* и *C.striatum*, исследованных как в монокультуре, так и в ассоциации с другими микроорганизмами, достоверно не отличались между собой.

Способность штаммов недифтерийных коринебактерий в зависимости от исследования в монокультуре или в ассоциации с представителями УПМ и между собой вызывать в разной степени программированную гибель клеток может быть обусловлена особенностями их симбиотических взаимодействий. Механизмы апоптогенного действия микроорганизмов различны и могут быть связаны с угнетением процессов синтеза белка, повреждением цитоплазматической и митохондриальной мембран, проникновением эффекторных молекул в клетки хозяина и др. (9,11).

Причем, микроорганизмы могут использовать одновременно несколько механизмов апоптогенного действия, интерференция которых при сочетанном воздействии на клетки и обуславливает повышение или снижение процессов программированной гибели клеток.

Процессы апоптоза, индуцируемого *Corynebacterium non diphtheriae*, связаны с их персистентными и, как следствие, патогенными свойствами.

Выводы

1. *Corynebacterium non diphtheriae* обладают способностью индуцировать процессы апоптоза перитонеальных макрофагов мышей, что является одним из механизмов реализации их патогенных свойств.
2. Изменение апоптогенной активности *Corynebacterium non diphtheriae* при сочетанном воздействии на макрофаги с УПМ и между собой связано с особенностями их симбиотических взаимоотношений, обуславливающих персистенцию в организме.

Литература

1. Краева Л.А., Манина Ж.Н., Ценева Г.Я. и соавт. Этиологическое значение *Corynebacterium non diphtheriae* у больных с различной патологией. Журн. микробиологии. 2007; 5: 3-7.
2. Bonmarin I., Guiso N., Grimont Patrik A.D., Diphtheria: A zoonotic disease in France? Vaccine 2009; 27(31): 4196-200.
3. Cintia Silva dos Santos, Louisy Sanches dos Santos, Monica Cristina de Souza, Fernanda. Non-opsonic phagocytosis of homologous non-toxicogenic and *Corynebacterium diphtheriae* strains by human U-937 macrophages. Microbiol Immunol 2010; 54: 1-10.
4. Kanungo R., Vijayalakshmi N., Nalini P. Diphtheria duo to non-toxicogenic *corynebacterium diphtheriae*: A report of two cases. Indian Journal of Medical Microbiologi. 2002; 1: 50-52.
5. Миронов А.Ю., Харсеева Г.Г., Клюкина Т.В. Основы клинической микробиологии и иммунологии. Учебное пособие. Ростов-на-Дону, 2011: 248с.
6. Karen L. Knox and Alison H. Holmes Nosocomial Endocarditis caused by *Corynebacterium amycolatum* and Other Nondiphtheriae *Corynebacterium*. J. Emerging Inf. Diseases 2002; Vol.8, 1: 14-17.
7. Краева Л.А., Ценева Г.Я. Изменение чувствительности к антибиотикам у микроорганизмов рода *Corynebacterium* в Санкт-Петербурге и Ленинградской области. Здоровье населения и среда обитания. 2011; 2: 25-27.
8. Belmares J., Dettlerline S., Pak J.B. and Parada P. Jorge. *Corynebacterium endocarditis* species-specific risk factors and Outcomes. BMC Infectious Diseases 2007; Feb 6; 7:4.
9. Mattos-Guaraldi, A.L., Formiga, L.C.D. & Pereira, G.A. Cell surface components and adhesion in *corynebacterium diphtheriae*. Microbes Infect. 2000; 2: 1507-1512.
10. Харсеева Г.Г., Москаленко Е.П., Трухачев А.Л. и соавт. Патогенные свойства *C.diphtheriae*, циркулирующих в г.Ростове-на-Дону и Ростовской области в межэпидемический период. Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунол. 2006; 6: 6-9.
11. Kochi, S.K. and Collier, R.J. DNA fragmentation and cytolysis in U937 cells treated with diphtheria toxin or other inhibitors of protein synthesis. Exp Cell Res 1993; 208:296-302.
12. Костюкова Н.Н., Михайлова В.С., Малахов В.Н. и соавт. Опыт проведения внешней оценки качества идентификации видов рода *Corynebacterium*. Клиническая лабораторная диагностика. 2002; 12: 43-45.

Сведения об авторах

1. Харсеева Галина Георгиевна, заведующая кафедрой микробиологии и вирусологии №2 Ростовского государственного медицинского университета (ГБОУ ВПО РостГМУ), доктор медицинских наук, e-mail: galinagh@bk.ru, служебный адрес: 344022, Ростов-на-Дону, Нахичеванский пер., 29, РостГМУ, рабочий телефон 8(632) 250-41-09, 8-918-575-44-65 (мобильный).
2. Воронина Наталья Александровна, старший лаборант кафедры микробиологии и вирусологии №2, ГБОУ ВПО РостГМУ, г.Ростов-на-Дону
3. Алутина Эльвира Львовна, старший лаборант кафедры микробиологии и вирусологии №2, ГБОУ ВПО РостГМУ, г.Ростов-на-Дону
4. Миронов Андрей Юрьевич, доктор медицинских наук, профессор кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии ПМГМУ им. И.М. Сеченова, г. Москва
5. Мамычева Наталья Ивановна, врач-бактериолог, МУЗ «Городская больница №1» лаборатория бактериологических исследований, г.Гуково, Ростовская область,
6. Голованова Наталья Андреевна, врач-бактериолог, Областная детская больница КДЛ, г.Ростов-на-Дону

Поступила 12.01.2012 г.