

# Wpływ otoczki na pochłanianie i przeżywanie gronkowców w granulocytach PMN izolowanych z krwi bydlęcej

KRYSTYNA KRÓLIKOWSKA, ANNA NIEDZIELSKA

Pracownia Mikrobiologii Instytutu Biologii WSP, ul. M. Konopnickiej 15, 25-406 Kielce

Królikowska K., Niedzielska A.

## The influence of capsules in phagocytosis and survival of staphylococci within PMN granulocytes isolated from bovine blood

### Summary

The research work concentrated on the phagocytes activity and intracellular destruction of four staphylococci strains by PMN granulocytes isolated from bovine blood. Two of the strains were encapsulated and possessed different abilities to produce coagulase - *S. aureus* M, *S. simulans* 76; the following two strains were un-encapsulated and coagulase-positive - *S. aureus* M<sub>60</sub> and *S. aureus* M<sub>12</sub>. The strains were then opsonized with heterologous bovine serum.

The 90 minute study showed that un-encapsulated strains of *S. aureus* M<sub>12</sub> and *S. aureus* M<sub>60</sub> were ingested 35% and 85% respectively and were intracellularly destroyed 20% and 16% respectively. The encapsulated strains of *S. aureus* M and *S. simulans* 76 were absorbed by 6% and 23%. Both survived inside granulocytes because the percentage of destruction was 0%.

The results suggest that capsules of staphylococci considerably lower the rate of phagocytes activity and eradicate destruction inside PMN cells.

**Keywords:** granulocytes PMN, bovine blood, staphylococci.

Bakterie z zewnątrz otoczone są zwykle otoczką o różnicowanej grubości i składzie chemicznym. U jednych bakterii otoczki mogą być cienkie i niedostrzegalne przy obserwacji mikroskopowej, wtedy wykrywa się je metodami serologicznymi, u innych tworzą wokół komórki grubą warstwę, którą uwidocznić można poprzez barwienie negatywne. Służą otoczkiwe odgrywają u bakterii rolę ochronną, chroniąc je przed szkodliwymi czynnikami zewnętrznymi m.in. przed fagocytozą.

Zjawisko fagocytozy odgrywa podstawową rolę w mechanizmie odporności komórkowej (7, 8). Najważniejszą funkcją granulocytów PMN jest pochłanianie, po którym następuje wewnątrzkomórkowe zabijanie pochłoniętych bakterii. Większość gronkowców wewnątrz granulocytów PMN jest zabijanych na skutek reakcji bakteriobójczych aktywowanych komórek. Zarówno ludzkie granulocyty, jak i bydlęce, w doświadczeniach *in vitro* niszczą pochłonięte gronkowce w kilkudziesięciu procentach (2). Uważa się, że stany zapalne określane mianem chronicznych są wynikiem upośledzenia reakcji zabijania gronkowców przez granulocyty. Badania Andersona i Williamsa (2) wy-

kazały, że w przewlekłych zapaleniach wymion u bydła na skutek zakażenia gronkowcem, bakterie nie były zabijane wewnątrz komórek PMN po pochłonięciu. Udowodniono także rolę otoczki bakteryjnej w efektywności pochłaniania i wewnątrzkomórkowego niszczenia bakterii przez granulocyty (1, 6, 9). Otoczka, osłaniając receptory w ścianie komórkowej dla dopełniacza i immunoglobulin (opsonin), hamuje pochłanianie bakterii. Opsonizacja i pochłanianie bakterii następują w obecności specyficznych przeciwciał antyotoczkowych. Obecność otoczki wpływa także na przeżycie gronkowców pochłoniętych przez granulocyty PMN, jak i paciorkowców pochłoniętych przez makrofagi (1, 2, 3).

Celem pracy było określenie wpływu obecności otoczki u gronkowców na pochłanianie i wewnątrzkomórkowe niszczenie przez granulocyty PMN izolowane z krwi bydlęcej.

### Materiał i metody

**Granulocyty.** Granulocyty PMN otrzymywano ze świeżej krwi obwodowej bydlęcej metodą Carlsona i Kaneko (4). Pobraną na heparynę krew (4 j./ml) wirowano, dekan-

towano osocze i limfocyty. Pozostałe krwinki dzielono na porcje, wirowano. Czerwone krwinki poddawano lizie przez dodanie wody. Przywracano izotoniczność roztworu dodając 2,7% objętości, NaCl 0,85%. Granulocyty PMN z dna probówek płukano dwa razy roztworem PBS (z heparyną i żelatyną). Doprowadzano ostateczne stężenie komórek do gęstości  $1 \times 10^6$ /ml licząc w komorze Thoma-Zeissa. Żywotność komórek sprawdzano przy użyciu 0,2% roztworu błękitu trypanu.

**Opsoniny.** Krew obwodową pobierano na skrzep od kilku krów. Po wirowaniu ściągano surowicę. Zbiornicą surowicę ogrzewano w  $56^\circ\text{C}$  przez 30 minut, dzielono na porcje, zamrażano w  $-20^\circ\text{C}$ .

**Gronkowce.** Badania przeprowadzono na następujących szczepach: *Staphylococcus aureus* M (NCTC 10649) otoczkowy, koagulazododatni, *Staphylococcus simulans* 76, otoczkowy, koagulazoujemny, *St. aureus* M<sub>60</sub> i *St. aureus* M<sub>12</sub> – bezotoczkowe, koagulazododatnie. Do badań sporządzano zawiesinę bakterii o gęstości  $1 \times 10^7$  j.t.k./ml.

**Opsonizacja.** Opsonizację bakterii przeprowadzono w temperaturze pokojowej w ciągu 20 minut, dodając do 0,9 ml zawiesiny bakterii 0,1 ml surowicy opsonizującej.

**Badanie pochłaniania i wewnątrzkomórkowego niszczenia gronkowców przez granulocyty metodą wysiewu i liczenia komórek bakteryjnych (5).**

W probówkach mieszano 0,9 ml zawiesiny leukocytów i 0,1 ml opsonizowanych gronkowców. W czasie 0, 30, 60 i 90 minut podczas inkubacji w  $37^\circ\text{C}$ , pobierano i wysiewano próbki celem określenia całkowitej liczby bakterii, liczby bakterii pochłoniętych i zabitych w granulocytach. Liczba bakterii w granulocytach oznaczała liczbę pochłoniętych bakterii, różnica w liczbie żywych bakterii w cza-

sie 0 i kolejnych czasach stanowiła procent zabitych bakterii. Dla każdego badanego szczepu bakterii wykonano 4 powtórzenia. Wyniki podano w postaci średniej.

## Wyniki i omówienie

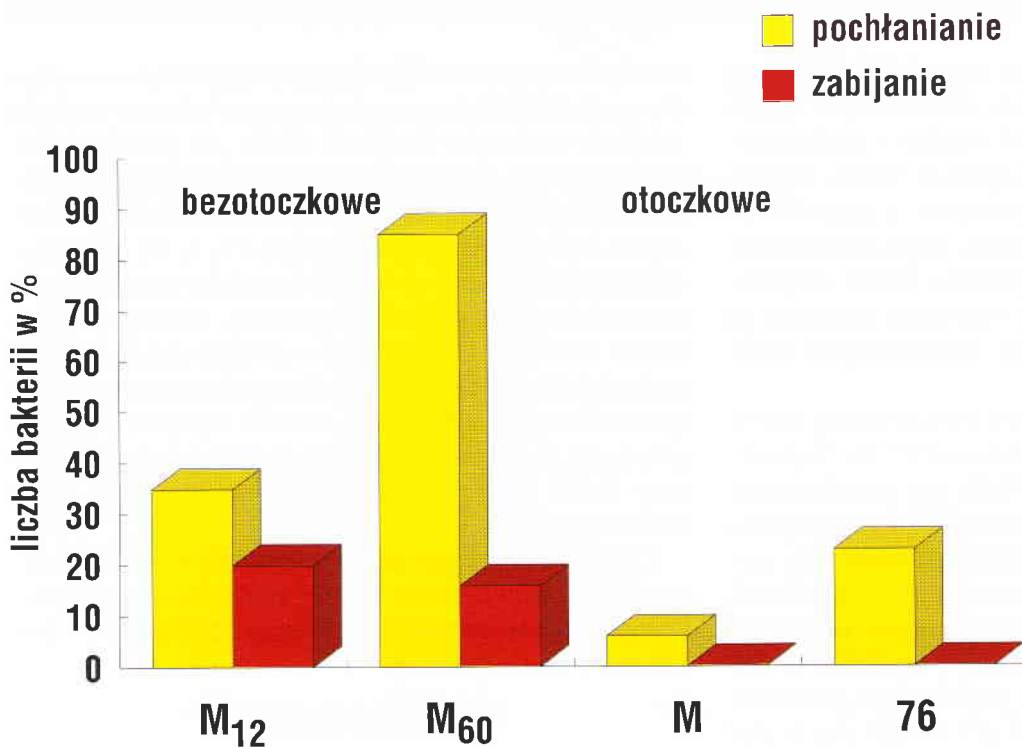
Wyniki przedstawiono na ryc. 1.

Wykazano, że w czasie 90 minut trwającego doświadczenia szczepy nie wytwarzające otoczki były pochłaniane stopniowo i w 90 minucie inkubacji procent pochłonięcia wynosił dla *St. aureus* M<sub>12</sub> 35%, a dla *St. aureus* M<sub>60</sub> 85%. W tym samym czasie szczep *St. aureus* M otoczkowy został pochłonięty w 6%, natomiast *St. simulans* 76, także wytwarzający otoczkę, w 23%.

Udział zabitych komórek bakterii po pochłonięciu przez granulocyty w badanym czasie był zróżnicowany i wynosił 20% dla bezotoczkowych szczepów *St. aureus* M<sub>12</sub> i 16% dla *St. aureus* M<sub>60</sub>, natomiast dla szczepów otoczkowych *St. aureus* M i *St. simulans* 76 nie stwierdzono zabijania wewnątrzkomórkowego, tym samym zdolność przeżycia bakterii była całkowita. Żywotność granulocytów obliczona w procentach wynosiła średnio 80-85%.

Przeprowadzone badania pochłaniania i wewnątrzkomórkowego niszczenia gronkowców otoczkowych i bezotoczkowych przez granulocyty PMN izolowane z krwi bydłowej wykazały znaczące różnice w podatności bakterii na te reakcje. Opsonizacja przez surowice heterologiczne dotyczyła wszystkich badanych szczepów. Najbardziej podatny na pochłanianie okazał się szczep bezotoczkowy *St. aureus* M<sub>60</sub>, który był ponad dwukrotnie wrażliwszy na tę reakcję niż bezotoczkowy *St. aureus* M<sub>12</sub>. Najmniej podatny na pochłanianie był *St. aureus* M i *St. simulans* 76. Oba posiadały otoczkę.

Procent zabijania wynosił 20 i 16 dla szczepów M<sub>12</sub> i M<sub>60</sub> (odpowiednio), podczas gdy u szczepów otoczkowych *St. aureus* M i *St. simulans* 76 zabijania nie stwierdzono. Według Andersona i Williamsa (2) procent przeżycia szczepów bezotoczkowych był mniejszy od 5, a szczepy otoczkowe także przeżywały wewnątrz granulocytów. Autorzy ci wykazali istotny wpływ stężenia opsonin na skuteczność przeżycia bakterii opłaszczonych. Wyższe stężenia opsonin wzmacniały zabijanie bakterii.



Ryc. 1. Procentowe wartości pochłaniania i wewnątrzkomórkowego zabijania bakterii przez granulocyty PMN

Komórki szczepu *St. aureus* M<sub>12</sub> (bezotoczkowy) były najbardziej podatne na zabijanie, jeśli wziąć pod uwagę procent pochłonięcia, który wynosił 35, a zabijania 20. Najmniej wrażliwe na niszczenie były komórki *St. simulans* 76, gdyż spośród 23% komórek pochłoniętych przez fagocyty nie stwierdzono zabijania. Wymienieni autorzy (2) stwierdzili dużą oporność *St. simulans* na enzym lizostafinę, którego działanie powinno spowodować rozpad komórek będących poza granulocytami PMN.

Wpływ otoczki na zjawisko fagocytozy został udowodniony w pracy dotyczącej pochłaniania *Streptococcus suis* przez mysie makrofagi (3). Po 1 godz. inkubacji niewirulentne otoczkowe bakterie były pochłaniane przez mniej niż 7% makrofagów, ich bezotoczkowe mutanty przez ponad 68% makrofagów. Według Almeidy i Olivera (1) fagocytoza pięciu otoczkowych szczepów *Streptococcus uberis* wynosiła od 43 do 51%, a wewnątrzkomórkowe zabijanie 25 do 40%. Natomiast fagocytoza pięciu szczepów bezotoczkowych wynosiła 66-74%, a wewnątrzkomórkowe zabijanie 65-75%. Autorzy ci zaobserwowali także wpływ homologicznej surowicy opsonizującej na bakterie otoczkowe; podobne wyniki otrzymała w swojej pracy Giedrys-Galant (5).

## Wnioski

1. Otoczka bakteryjna w istotny sposób wpływa na aktywność pochłaniania i zabijania bakterii przez granulocyty PMN. Wyniki wykazały, że obecność otoczki u badanych gronkowców znacznie zmniejszała pochłanianie oraz uniemożliwiała zabijanie wewnątrz komórek PMN.

2. Do optymalnej opsonizacji otoczkowych szczepów gronkowców wymagana jest obecność homologicznych przeciwciał dla otoczki.

## Piśmiennictwo

1. Almeida R. A., Oliver S. P.: J. Vet. Med. B 42, 331, 1995.
2. Anderson J. C., Williams M. R.: J. Med. Microbiol. 20, 317, 1985.
3. Brazeau C., Gottschalk M., Vincelette S., Martineau-Doizle B.: Microbiology 142, 1231, 1996.
4. Carlson G. P., Kaneko J. J.: Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 142, 853, 1973.
5. Giedrys-Galant S.: Med. Dośw. 39, 213, 1987.
6. Hogan J. S., Todhunter D. A., Smith K. L., Schoenberger P. S., Wilson R. A.: J. Dairy Sci. 75, 3324, 1992.
7. Kowalska M., Denys A.: Post. Mikrobiol. 24, 29, 1985.
8. Kluciński W., Niemiałowski M., Winnicka A., Degórski A., Gonzales-Gonzales M.: Pol. Arch. Wet. 30, 3, 1990.
9. Peterson P. K., Wilkinson B. J., Kim Y., Schmeling D., Quie P. G.: Infect. Immunity 19, 943, 1978.

Adres autora: dr Krystyna Królikowska, ul. Kalcytowa 3/55, 25-705 Kielce

## PTNW w Internecie

Jesienią 1998 roku rozstrzygnięty został konkurs organizowany przez Fundację im. Stefana Batorego w ramach programu „Internet dla Lekarzy”. Z przyjemnością informujemy, że projekt opracowany przez nowy ZG PTNW znalazł się w gronie zwycięzców i obecnie przystępujemy do jego realizacji.

Celem projektu jest umożliwienie wykorzystania w codziennej działalności Towarzystwa Internetu. Niezbędne jest więc stworzenie do tego technicznych możliwości. Dzięki olbrzymiej życzliwości władz SGGW, a szczególnie JM Rektora Prof. dr hab. Włodzimierza Klucińskiego i Dyrektora Centrum Informatycznego SGGW mgr Marii Trąmpczyńskiej, doprowadzono już do siedziby Zarządu Głównego sieć komputerową. Wkrótce zakupiony zostanie także niezbędny sprzęt i oprogramowanie. Projekt obejmuje także stworzenie strony domowej Towarzystwa. Zgodnie z projektem strona ta będzie składała się z części informacyjnej (podstawowe dane dotyczące Towarzystwa, jego władz, Oddziałów, Sekcji, aktualne informacje o organizowanych szkoleniach, sesjach i sympozjach)

oraz części edukacyjnej, na której upowszechniane będą materiały szkoleniowe pochodzące z organizowanych przez Towarzystwo konferencji. Pragniemy aby strona ta była sukcesywnie, stale modyfikowana i uzupełniana.

Serdecznie zapraszamy wszystkich członków Towarzystwa do włączenia się w realizację tego projektu i do współredagowania strony. Będziemy wdzięczni za wszelkie uwagi, sugestie i pomysły. Prosimy kierować je na ręce Sekretarza Administracyjnego ZG PTNW lek. wet. Jarosława Kaba (e-mail: kaba@amaltea.sggw.waw.pl), który jest osobą odpowiedzialną za realizację projektu.

Dzięki uzyskanym funduszom Towarzystwo będzie miało nowe możliwości zaprezentowania swojej pracy i dorobku, także w wymiarze międzynarodowym. Biuro ZG PTNW otrzyma zaś, od dawna oczekiwane, godne dla rangi Towarzystwa, wyposażenie techniczne.

**Zarząd Główny PTNW**