

ВОСПРИИМЧИВОСТЬ ОРГАНИЗМА К ПАТОГЕНАМ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ГОМЕОСТАЗА ЖЕЛЕЗА

© *Леонов В.В.¹, Миронов А.Ю.²*

¹ **Кафедра микробиологии Ханты-Мансийской государственной медицинской академии, Ханты-Мансийск;** ² **Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского, Москва**

E-mail: andy.60@mail.ru

Исследовано влияние гомеостаза железа на механизмы врожденного иммунитета. Латентный дефицит железа (ЛДЖ) и железodefицитная анемия (ЖДА) сопровождались снижением функциональной активности клеточного и гуморального звена врожденного иммунитета, что выражено в снижении всех показателей фагоцитоза, активности системы комплемента, бактерицидной активности сыворотки крови (БАСК). Иммуносупрессия зависит от выраженности анемического синдрома. При экспериментальном создании дефицита и избытка сывороточного железа обнаружено, что фагоцитарная активность практически не зависит от концентрации железа и присутствия хелатора, БАСК снижалась как при дефиците, так и избытке сывороточного железа. Результаты исследования свидетельствуют о значимости поддержания узкого диапазона концентраций железа организма, в пределах которого осуществляется взаимодействие хозяина с патогенами. Выход из этого оптимального для хозяина диапазона ведет к увеличению восприимчивости организма к патогенам.

Ключевые слова: железо сыворотки, бактерицидная активность сыворотки, фагоцитоз, комплемент, железodefицитная анемия, восприимчивость к патогенам.

BODY SUSCEPTIBILITY TO PATHOGENS DEPENDING ON IRON HOMEOSTASIS

Leonov V.V.¹, Mironov A.Yu.²

¹ **Department of Microbiology of Khanty-Mansiysk State Medical Academy, Khanty-Mansiysk;**

² **G.N. Gabrichevsky Moscow Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Moscow**

We studied the effects of iron homeostasis on the mechanisms of innate immunity. Latent iron deficiency and iron deficiency anemia were accompanied by a decrease in the functional activity of cellular and humoral innate immunity that is expressed in the reduction of all parameters of phagocytosis, the activities of the complement system, and the bactericidal activity of serum. Immunosuppression depended on the degree of anemia. The experimental modeling of serum iron deficit and excess revealed that phagocytic activity did not apparently depend on the presence and concentrations of iron chelator, and bactericidal activity of serum decreased both in serum iron deficit and excess. The study shows the importance of maintaining a narrow range of iron concentrations within which the host interaction with pathogens occurs. The change in this optimal range for the host organism leads to the increased susceptibility to pathogens.

Keywords: serum iron, serum bactericidal activity, phagocytosis, complement, iron deficiency anemia, susceptibility to infection.

Железо играет важную роль в регуляции вирулентности и устойчивости микроорганизмов к противомикробным факторам [7, 9, 10, 11]. Нарушение гомеостаза железа в организме человека ведет к изменениям его восприимчивости к микробам. Избыточное накопление железа при серповидно-клеточной анемии, β -талассемии и гемохроматозы увеличивает восприимчивость организма человека к патогенам [13, 21], своеобразным маркером гемохроматоза являются абсцессы печени и бактериемия, вызванные *Yersinia enterocolitica* и *Y. pseudotuberculosis* [17]. Скрытый дефицит железа клинически проявляется снижением резистентности организма к патогенам [15, 16, 22]. Среди детей с железodefицитной анемией (ЖДА) заболеваемость респираторными инфекциями в 2-4 раза, а кишечными – в 2 раза выше [2]. При латентном дефиците железа

(ЛДЖ) заболеваемость респираторными вирусными инфекциями повышается в 1,5-2 раза. Процент бактериальных осложнений после перенесенных респираторных вирусных инфекций у детей с ЖДА в 2 раза выше, чем у здоровых. Однако существует мнение, что инфекции при ЖДА возникают не чаще, чем у здоровых [1].

С нашей точки зрения, противоречия объясняются разными условиями эксперимента и неоднородностью сравниваемых групп. Для оценки показателей фагоцитоза, бактерицидной активности сыворотки крови (БАСК) разными авторами используются не только различные штаммы, но и виды микроорганизмов, не учитывается железозависимость их вирулентных свойств. В данном исследовании изучено влияние гомеостаза железа на гуморальные и клеточные факторы врожден-

ного иммунитета в одной возрастной группе при использовании одного штамма микроорганизма.

Цель работы – изучить влияние гомеостаза железа на клеточные и гуморальные факторы врожденного иммунитета.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Для эксперимента использована кровь доноров мужского пола с 0 (I) Rh (+) группой крови в возрасте от 20 до 35 лет. Кровь брали с помощью вакуумной системы Vacutainer в пластиковые пробирки с гепарином. В крови определяли параметры гомеостаза железа (содержание гемоглобина – Нб, ферритина, сывороточного железа – $[Fe^{2+}]_{сыв.}$, общую железосвязывающую способность сыворотки – ОЖСС). Сыворотку получали общепринятыми методами. Для экспериментов использована сыворотка доноров с нормальным гомеостазом железа, ЖДА, избытком железа, последнее создавалось искусственно путем добавления стерильного раствора цитрата железа (II). Обследовано 58 доноров, которые разделены на 3 группы – здоровые доноры (20 человек), доноры с ЛДЖ (15 человек) и истинной ЖДА (23 человека).

Для оценки гуморального иммунитета использовано определение БАСК по Бюхнеру. К исследуемой сыворотке в объеме 1 мл добавляли 0,1 мл 1 млрд взвеси суточной культуры *Escherichia coli* 25922 ATCC. Затем делали два посева на чашки Петри с МПА. Один посев – сразу же после смешивания культуры с сывороткой (контроль), второй – после инкубации 60 мин при 37°C (опыт). Посевы инкубировали 18 ч, затем подсчитывали число выросших колоний на опытной и контрольной чашках. По формуле определяли БАСК:

$$БАСК = \frac{(A - A_1)}{A} \times 100\%,$$

где А – число колоний на контрольной чашке;
А₁ – число колоний на опытной чашке;

БАСК – индекс бактерицидной активности сыворотки крови, %. Значения БАСК от 80 до 90% считали нормой [5].

Для оценки клеточного иммунитета оценивали фагоцитоз. Оценивалась поглотительная способность нейтрофилов в отношении *E. coli* 25922 ATCC в виде фагоцитарного числа – ФЧ (норма – 4,5-7,5) и индекса завершенности фагоцитоза – ИЗФ (норма – 1,25-2,8) после инкубации в течение 30 и 120 мин. Активность клеток оценивалась в НСТ-тесте (спонтанный – сп и стимулированный *E. coli* 25922 ATCC – ст) [20]. Активность комплемента оценивалась по 50% гемолизу сенсibilизированных эритроцитов [19]. Статистическая достоверность различий оценивалась с помощью t-критерия Стьюдента и U-критерий Манна-Уитни.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В сыворотках доноров мужского пола с ЛДЖ концентрация сывороточного железа и ферритина достоверно меньше контрольной группы ($p > 0,05$), а ОЖСС соответственно увеличивалась (табл. 1). При ЖДА концентрация сывороточного железа и ферритина уменьшались в 2,9 и 5,0 раза соответственно, ОЖСС увеличилась в 1,5 раза относительно контрольной группы ($p > 0,05$). В группе доноров с ЖДА изменялись общие показатели крови. Обнаружено повышение величины СОЭ и изменения в формуле периферической крови: повышается количество лимфоцитов и снижается число моноцитов и ацидофилов.

Таблица 1

Исследуемые показатели у обследуемых доноров с ЛДЖ и ЖДА (M ± m)

Показатель	Контрольная группа (n = 20)	Группа с ЛДЖ (n = 15)	Группа с ЖДА (n = 23)
Нб, г/л	162±0,6	135±0,3*	108±0,5*
ОЖСС, мкМ	52,2±0,2	63,4±0,8*	77,3±0,3*
$[Fe^{2+}]_{сыв.}$, мкМ	25,3±0,1	12,7±0,6*	8,8±0,2*
Ферритин, нг/мл	66,5±0,2	25,1±0,3*	13,4±0,7*
ИЗФ	1,8±0,01	1,2±0,2	0,8±0,01*
ФЧ	5,20±0,02	4,52±0,03*	4,1±0,01*
НСТ сп, %	25,2±0,8	21,3±0,7*	13,1±0,5*
НСТ ст, %	59,4±1,1	38,2±0,6*	22,4±1,5*
БАСК, %	83,3±2,6	77,2±3,4*	62,4±3,1*
Активность комплемента, CH ₅₀	40,7±1,1	33,3±1,8*	27,4±0,2*

Применение: звездочкой (*) обозначены достоверные отличия от показателей контрольной группы ($p < 0,05$).

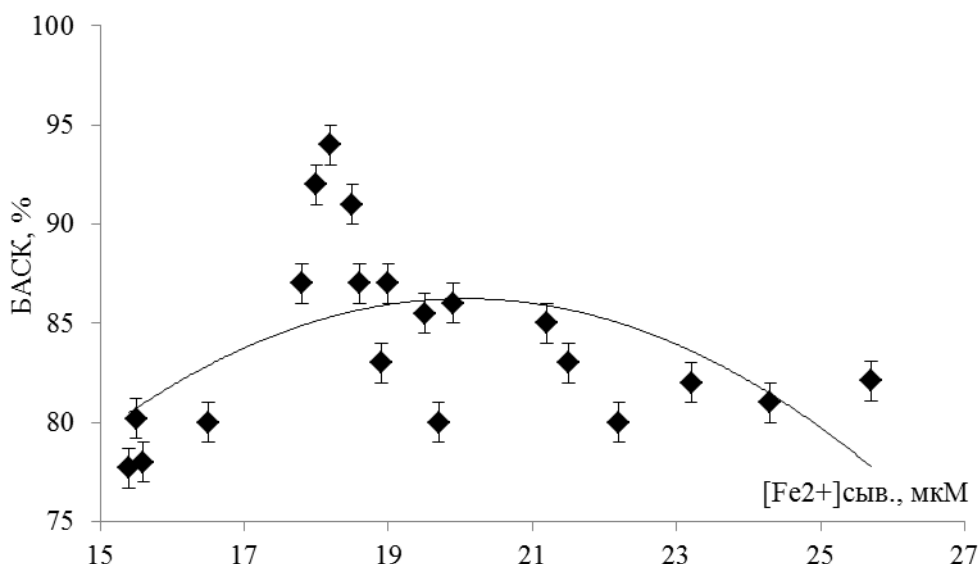


Рис. 1. Влияние концентрации сывороточного железа в контрольной группе на БАСК.

Таблица 2

Концентрация сывороточного железа и показатели фагоцитоза и БАСК

[Fe ²⁺] _{сыв.} , мкМ	0*	15,5	25,3	34,3	50,4
ФЧ	4,5±0,2	4,8±0,2	5,2±0,10	4,8±0,1	5,0±0,2
ИЗФ	1,2±0,1	1,2±0,1	1,6±0,1	1,4±0,1	1,4±0,2
БАСК, %	70,2±1,3	84,4±2,5	89,8±3,3	75,2±1,5	-

Примечание: звездочкой (*) обозначено, что в сыворотку донора добавили хелатор железа.

Фагоцитоз — универсальный механизм иммунитета, обеспечивающий защиту от всех микроорганизмов [3, 12]. При оценке показателей фагоцитоза в зависимости от гомеостаза железа донора выявлено снижение функциональной активности нейтрофилов уже при ЛДЖ, ФЧ и ИЗФ достоверно уменьшались. Снижались показатели кислородо зависимых механизмов фагоцитоза в спонтанном и стимулированном НСТ-тесте. У доноров с ЖДА указанные изменения имели более выраженный характер, уменьшались ФЧ и ИЗФ, фагоцитоз носил незавершенный характер. Резко снижались значения спонтанного и стимулированного НСТ-теста по сравнению с контрольной группой, что может свидетельствовать об истощении энергетического потенциала клетки [4]. Железо необходимо для развития респираторного взрыва, поэтому логично, что при истощении запасов внутриклеточного железа фагоцитоз носит незавершенный характер.

Активность системы комплемента важна в регуляции восприимчивости организма к патогенам. Комплемент защищает млекопитающих преимущественно от грамотрицательных патогенов, является источником опсонин для фагоцитоза [3]. Исследование активности системы комплемента по CH₅₀ выявило уменьшение активности при

ЛДЖ и ЖДА в 1,2 и 1,5 раза соответственно по сравнению с контрольной группой. Суммарную активность гуморальных факторов врожденного иммунитета производили по оценке интегрального показателя – БАСК. При ЛДЖ происходит уменьшение БАСК в 1,1 раза, а при ЖДА в 1,3 раза по сравнению с контрольной группой доноров.

Дефицит железа сопровождается снижением функциональной активности клеточного и гуморального звена врожденного иммунитета, что выражено в снижении всех показателей фагоцитоза, активности системы комплемента, БАСК. Иммуносупрессия зависит от выраженности анемического синдрома, наименьшие значения показателей фагоцитоза, активности системы комплемента, БАСК характерны для доноров с ЖДА.

Зависимость БАСК от концентрации сывороточного железа в группе доноров с нормальным гомеостазом железа имеет куполообразный вид (рис. 1). Максимальные значения БАСК наблюдались при концентрациях сывороточного железа у доноров в диапазоне 18,0÷19,0 мкМ. Минимальные значения БАСК имела у доноров с концентрацией сывороточного железа в диапазоне 15,0÷17,0 мкМ. Дальнейшее увеличение концентрации сывороточного железа

вело к уменьшению БАСК, однако все значения соответствовали норме.

Для понимания вклада в регуляцию механизмов врожденного иммунитета концентрации сывороточного железа проведен эксперимент. В каждую из сывороток доноров контрольной группы добавлены разные концентрации цитрата железа (II) и хелатора железа – феррозина. Эксперимент позволил нивелировать влияние прочих условий на показатели иммунитета. Оценены БАСК и показатели фагоцитоза. Результаты приведены в табл. 2.

Фагоцитоз всегда носил завершенный характер, значение ФЧ соответствовало норме (4,5-7,0). Увеличение концентрации сывороточного железа от 0 до 25,3 мкМ вело к увеличению ФЧ и ИЗФ, дальнейшее увеличение концентрации железа достоверно не меняло эти показатели. Изменение концентрации железа от 15,5 до 25,3 мкМ в сыворотке здоровых доноров не вело к существенным изменениям БАСК, она изменялась в пределах от 84,4 до 89,8%, что соответствует значениям нормы. Как увеличение концентрации сывороточного железа, так и его хелатирование феррозином уменьшало БАСК на 5-10% от нижней границы нормы. Увеличение концентрации железа выше 34,4 мкМ вело к получению отрицательных результатов БАСК, так как железонагруженная сыворотка стимулировала рост *E. coli*.

Выявлена зависимость активности гуморальных факторов врожденного иммунитета от концентрации сывороточного Fe^{2+} . Наблюдается снижение БАСК в 1,1-1,5 раза, как при дефиците, так и при избытке сывороточного железа. Фагоцитарная активность практически не зависит от концентрации экзогенного железа и присутствия хелатора железа, что можно объяснить наличием ферритинового депо железа, которое по мере необходимости может быть включено в кислородзависимые механизмы бактерицидности при фагоцитозе, а также стимулирующим влиянием железа на факторы вирулентности микроорганизмов [6].

Результаты исследования свидетельствуют о значимости поддержания узкого диапазона концентраций железа в организме, контролируемого гомеостазом железа, в пределах которого осуществляется взаимодействие хозяина с патогенами. Выход из этого оптимального для хозяина диапазона ведет к увеличению восприимчивости организма к патогенам. Это особенно важно для понимания причин возникновения оппортунистических инфекций, вызываемых условно-патогенной микробиотой.

Таким образом, при избыточном накоплении железа организм человека не может ограничить

потенциальных патогенов в возможности его использовать для повышения своей вирулентности и ростовой активности. Данный эффект, скорее всего, носит универсальный характер, так как, по современным данным, железо считается жизненно необходимым практически для всех микроорганизмов [11, 14].

При дефиците железа на фоне угнетения клеточного и гуморального звена иммунитета организм содержит мало железа, доступного для усвоения микроорганизмами, что должно снижать их вирулентность. В условиях сильного ограничения по железу микроорганизмы могут повышать свою вирулентность за счет синтеза гемолитических субстанций, сидерофоров, делающих доступным для усвоения железо гемопротеинов и железосвязывающих белков [8, 11, 18]. Результат взаимодействия микро- и макроорганизма в данном случае будет определяться биологическими свойствами патогена.

ЛИТЕРАТУРА

1. Баркова Э.Н., Жданова Е.В., Курлович Н.А. Хронофизиология и хронопатология обмена железа. – Екатеринбург : Полиграфист, 2001. – 239 с.
2. Бисярина В.П., Казакова Л.М. Железодефицитные анемии у детей раннего возраста. – М. : Медицина, 1979. – 175 с.
3. Воробьев А.А., Миронов А.Ю., Несвижский Ю.В., Нечаев Д.Н. Учение об инфекции // Учебное пособие под ред. акад. РАМН А.А. Воробьева. – М. : Издательский дом «Русский врач», 2000. – 82 с.
4. Головин А.А., Соколова Т.Ф. Состояние и причины изменения иммунологической реактивности у больных железодефицитной анемией // Гематол. и трансфузиология. – 1992. – Т. 37, № 7/8. – С. 17-20.
5. Евтушенко А. Д., Тимохина Т. Х., Арзунова Г. А. Модифицированный способ бактериологического определения бактерицидной активности сыворотки крови // Лаб. дело. – 1982. – № 12. – С. 41-42.
6. Козырев Д.П., Васинова Н.А. Роль железорегулируемых генов в патогенности бактерий // Цитология. – 2004. – Т. 46, № 5. – С. 465-472.
7. Леонов В.В., Молчанова Т.Н. Влияние железа на ростовые характеристики условно-патогенных бактерий // Медицинская наука и образование Урала. – 2011. – Т. 12, № 4. – С. 41-43.
8. Леонов В.В., Костерина В.В., Варнищына В.В., Тимохина Т.Х., Курлович Н.А. Железозависимый синтез гемолизина *Staphylococcus aureus* // Бюлл. эксперим. биол. и мед. – 2012. – Т. 153, № 1. – С. 49-51.
9. Леонов В.В., Миронов А.Ю. Биопленкообразование оппортунистических микроорганизмов в плазме крови в зависимости от содержания железа // Клиническая лабораторная диагностика. – 2016. – Т. 61, № 1. – С. 52-54.

10. Медицинская микробиология, вирусология и иммунология. Учебник для студентов медицинских вузов. – 2-е изд. / Под ред. А.А. Воробьева. – М. : Медицинское информационное агентство.– 704 с.
11. Миронов А.Ю., Леонов В.В. Железо, вирулентность и межмикробные взаимодействия условно-патогенных микробов // Успехи современной биологии. – 2016. – Т. 136, № 3. – С. 285-294.
12. Миронов А.Ю., Харсеева Г.Г., Клюкина Т.В. Основы клинической микробиологии. Учебное пособие / под ред. проф. А.Ю. Миронова. – Ростов-на-Дону: ГОУ ВПО РостГМУ, 2011. – 248 с.
13. Forbes J.R., Gros P. Divalent metal transport by Nramp proteins at the interface of host-pathogen interactions // Trends Microbiol. – 2001. – Vol. 9, N 8. – P. 397-403.
14. Hantke K. Iron and metal regulation in bacteria // Curr. Opin. Microbiol. – 2001. – Vol. 4, N 2. – P. 172-177.
15. Konig D., Weinstock C., Keul J., Northoff H., Berg A. Zinc, iron and magnesium status in athletes-influence on the regulation of exercise-induced stress and immune function // Exerc. Immunol. Rev. – 1998. – Vol. 4. – P. 2-21.
16. Klasing K.C. Nutritional modulation of resistance to infectious diseases // Poult. Sci. – 1998. – V. 77, N 8. – P. 1119-1125.
17. Le Gall J.Y., Jouanolle A.M., Fergelot P. Genetics of hereditary iron overload // Bull. Acad. Natl. Med. – 2004. – Vol. 188, N 2. – P. 247-262.
18. Miethke M., Marahiel M.A. Siderophore-based iron acquisition and pathogen control // Microbiol. Mol. Biol. Rev. – 2007. – Vol. 71, N 3. – P. 413-451.
19. Morgan B.P. Measurement of complement hemolytic activity, generation of complement-depleted sera, and production of hemolytic intermediates / In: Morgan, B.P. ed. Methods in molecular biology. Complement methods and protocols. Humana Press, Totowa, New Jersey. – 2000. – Vol. 150. – P. 61-71.
20. Park B.H., Fikrig S.M., Smithwick E M. Infection and nitroblue-tetrazolium reduction by neutrophils: A diagnostic acid // Lancet. – 1968. – Vol. 2, N 7567. – P. 532-534.
21. Pietrangelo A. Hereditary hemochromatosis // Annu. Rev. Nutr. – 2006. – Vol. 26. – P. 251-270.
22. Schoenherr W.D., Jewell D.E. Nutritional modification of inflammatory diseases // Semin. Vet. Med. Surg. (Small Anim.). – 1997. – Vol. 12, N 3. – P. 212-222.