فصلنامه علمی- پژوهشی زیست‌شناسی میکروارگانیسم‌ها
سال اول، شماره ۲، تابستان ۱۳۹۱، صفحه ۲۳- ۳۶
تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۰۷/۲۹ – تاریخ پذیرش: ۱۳۹۱/۱۰/۰۹

اثرعوامل مترشحه *استافیلوکوکوس اورئوس* بر بقای نوتروفیل‌ها و مونوسیت‌ها در شرایط *in vitro*

ناهیده افضل آهنگران: مربی ایمنولوژی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران، n.a.ahangran@gmail.com *
نوروز دلیرژ: استادیار ایمنولوژی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران، n.delirezh@urmia.ac.ir
ملاحت احمدی: دانشیار میکروبیولوژی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران، m.ahmadi@urmia.ac.ir

چکیده

مقدمه: با توجه به نقش شناخته شده اگزوپروتئین‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* در سرکوب کردن پاسخ ایمنی ذاتی در عفونت‌های انسانی، هدف از مطالعه حاضر، تعیین نقش عوامل مترشحه باکتری در زنده مانی نوتروفیل‌ها و مونوسیت‌ها در گاوان سالم و مبتلا به ورم پستان است.

مواد و روش‌ها: در تحقیق حاضر، پنج نمونه شیر از گاوان مبتلا به ورم پستان و پنج نمونه از گاوان سالم تهیه شد. نمونه خون هپارینه از گاوان مبتلا و سالم به منظور جداسازی نوتروفیل‌ها و مونوسیت‌ها گرفته شد. نوتروفیل‌ها با استفاده از داروی مگلومین و مونوسیت‌ها در هیستوپک جدا سازی شدند. عوامل مترشحه از باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* ATCC23219 تهیه و غلظت پروتئین موجود در آن به روش برادفورد به میزان ۴۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر تعیین شد.تأثیر غلظت‌های مختلف عوامل مترشحه بر میزان زنده مانی نوتروفیل‌ها و مونوسیت‌ها به ترتیب بروش فلوسیتومتری و ایمونوفلورسانس تعیین شد.

نتایج: در مورد گاوان سالم، عوامل مترشحه حاوی ۸۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر پروتئین و در مورد گاوان مبتلا به بیماری ۴۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر پروتئین، بیشترین مرگ سلولی مونوسیت‌ها و نوتروفیل‌ها را داشتند. بررسی مراحل مختلف آپوپتوز در مونوسیت‌ها و نوتروفیل‌های گاوان سالم و مبتلا به بیماری نشان داد که حضور عوامل مترشحه در گاوان سالم موجب کاهش آپوپتوزدر مونوسیت‌ها و در گاوان بیمار موجب افزایش آپوپتوز شد.

بحث و نتیجه‌گیری: ترشحات *استافیلوکوکوس اورئوس* باعث القا آپوپتوز و تا حدودی نکروز، هم در نوتروفیل‌ها و هم در مونوسیت‌های گاوان سالم و بیمار می‌شود، ولی این سلول‌ها در گاوان بیمار نسبت به مرگ سلولی حساس‌تر از گاوان سالم هستند. از طرفی در گاوان سالم نوتروفیل‌ها و در گاوان بیمار مونوسیت‌ها نسبت به مرگ سلولی حساس‌ترند. وقتی گاوان به بیماری ورم پستان *استافیلوکوکوس اروئوس* مبتلا می‌شوند، عوامل مترشحه از این باکتری تأثیر بیشتری روی مونوسیت‌ها نسبت به نوتروفیل‌ها دارند. آنچه مسلم است، تعیین دقیق محتویات ترشحات باکتری و نیز مکانیسم عمل آن‌ها به روشن شدن مطلب کمک خواهد کرد.

واژه‌های کلیدی: *استافیلوکوکوس اروئوس*، عوامل مترشحه باکتری، نوتروفیل، مونوسیت

---

* نویسنده مسؤول مکاتبات

مقدمه

عفونت‌های باکتریایی با طیف وسیعی از مکانیسم‌های دفاعی محافظت می‌شوند. این عفونت‌ها به دو دسته سیستم ایمنی ذاتی و سیستم ایمنی اکتسابی تقسیم می‌شوند. سیستم ایمنی ذاتی یا غیر اختصاصی نخستین سد دفاعی بر علیه اجرام بیماری‌زای مهاجم است که توسط محرک‌های مختلف فعال می‌شود، البته در اثر مواجهه مکرر با عوامل عفونی افزایش نمی‌یابد (۱).

یکی از شناخته شده‌ترین باکتری‌های مهاجم، *استافیلوکوکوس اورئوس* است. این باکتری در انسان و دام موجب ایجاد عفونت‌های مختلف می‌شود. از جمله عفونت‌های شایع ناشی از *استافیلوکوکوس اورئوس* در دام‌ها، ورم پستان است. ورم پستان یک بیماری التهابی است که دفاع غده پستانی در برابر آن توسط ایمنی هومورال و وابسته به سلول میانجی‌گری می‌شود. مطالعات نشان داده‌اند که نوتروفیل‌ها نخستین سلول‌های خط دفاعی پس از ورود باکتری در غده پستان هستند. قدرت و توانایی نوتروفیل‌ها در بیگانه خواری و یا انهدام باکتری‌های مهاجم در پایداری و استقرار عفونت داخل پستانی موثر است، به‌طوری‌که اگر نوتروفیل‌ها قادر به حذف باکتری از غده پستانی نشوند، عفونت به‌وقوع پیوسته و در نهایت مزمن می‌شود (۲).

استافیلوکوکوس اورئوس به‌عنوان یکی از مهم‌ترین عوامل ایجاد کننده ورم پستان در گاو، یک باکتری گرم مثبت، بی‌هوازی اختیاری، غیر متحرک و غیر اسپورزاست. اگزوتوکسین‌های مختلفی از جمله لکوسیدین، توکسین آلفا، انتروتوتوکسین‌ها، توکسین-۱ سندرم شوک توکسیک وتوکسین‌های اکسفولیاتیو توسط *استافیلوکوکوس اورئوس* تولید می‌شوند که در حدت آن نقش دارند (۳، ۴ و ۵). همچنین، *استافیلوکوک‌ها*، مولکول‌هایی تحت عنوان اجزای سطحی میکروبی شناسایی کننده مولکول‌های چسبنده ماتریکس[1] (MSCRAMM) تولید می‌کنند که در برگیرنده یک سری عوامل چسبندگی شامل: پروتئین متصل شونده به کلاژن، پروتئین متصل شونده به فیبرونکتین، پروتئین متصل شونده به فیبرینوژن، پروتئین متصل شونده به الاستین، عامل جمع کننده و عامل چسبندگی به ماتریکس هستند (۶).

نوتروفیل‌ها و مونوسیت‌ها به‌عنوان نخستین سلول‌های دفاعی غده پستان در برابر اجرام بیماری‌زای مهاجم شناخته می‌شوند. از این رو اختلال در عملکرد این سلول‌ها به افزایش حساسیت میزبان نسبت به عفونت‌های باکتریایی پستان منجر می‌شود (۷).

عملکرد *استافیلوکوکوس اورئوس* در القا آپوپتوزیس در طیف وسیعی از سلول‌های اپی‌تلیال، آندوتلیال، استئوبلاست‌ها، کراتینوسیت‌ها، لنفوسیت‌ها و ماکروفاژها طی مطالعات متعدد نشان داده شده است. همچنین، *استافیلوکوکوس اورئوس* با تنظیم آپوپتوزیس در سلول‌های ایمنی نظیر نوتروفیل‌ها موجب القا بیماری می‌شود (۸ و ۹). علاوه بر این، مشخص شده است که اگزوتوکسین‌های مترشحه از *استافیلوکوک‌ها* نقش مهمی در القا پاسخ‌های ایمنی بر ضد باکتری نیز دارند (۱۰).

با توجه به نقش شناخته شده عوامل مترشحه (اگزوتوکسین‌ها) *استافیلوکوکوس اورئوس* در سرکوب پاسخ ایمنی ذاتی در عفونت‌های انسانی، در مطالعه حاضر نقش عوامل مترشحه *استافیلوکوکوس اورئوس‌های* جدا شده از موارد ورم پستان گاو بر زنده مانی نوتروفیل‌ها و مونوسیت‌ها بررسی و با تأثیر

استافیلوکوکوس اورئوس‌های جدا شده از گاوان سالم بر نوتروفیل‌ها و مونوسیت‌ها مقایسه شد.

مواد و روش‌ها

تهیه نمونه شیر

از مهر تا آذر ماه سال ۱۳۹۰ تعداد پنج نمونه شیر از گاوان مبتلا به ورم پستان و پنج نمونه شیر از گاوان سالم از دامداری‌های صنعتی منطقه ارومیه که در شرایط یکسان نگهداری می‌شدند، پس از انجام آزمون CMT[۲] و تأیید ابتلا به ورم پستان، گرفته شد. ابتدا سر پستانک‌ها با آب ولرم شستشو شدند و سپس هر کارتیه به‌وسیله اتانول ۷۰ درصد، ضدعفونی و خشک شد. سه دوشش اولیه دور ریخته شد و حدود ۱۰ میلی‌لیتر نمونه شیر مربوط به کارتیه‌های درگیر، در یک لوله استریل جمع آوری شد (۱۱).

کشت و جدا سازی استافیلوکوکوس اورئوس

به منظور تشخیص ابتلا به ورم پستان ناشی از استافیلوکوکوس اورئوس و نیز تأیید سالم بودن دام‌های مورد مطالعه، ۱۰۰ میکرولیتر از هر نمونه شیر بر روی محیط مانیتول سالت آگار (مرک - آلمان ۱۰۵۴۰۴۵۰۰) انتقال داده، کشت اولیه تهیه و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. کلونی‌های زرد رنگ ظاهر شده بر روی این محیط (مشکوک به *استافیلوکوکوس اورئوس*) انتخاب و در محیط آگار خون‌دار (پرونادیسا- اسپانیا ۱۱۰۸۰۰) حاوی پنج درصد خون گوسفند خالص شد. برای تأیید تشخیص جدایه‌های مشکوک، رنگ آمیزی گرم، مشاهده منظره کلونی‌ها، آزمایش کاتالاز و کوآگولاز انجام شد. به این ترتیب پنج جدایه خالص *استافیلوکوکوس اورئوس* از موارد ورم پستان گاو جدا شد. شیرهای مربوط به دام‌های سالم با توجه به عدم وجود علایم بالینی، منفی شدن آزمایش CMT و عدم رشد نمونه در محیط کشت تأیید شد.

تهیه نمونه خون

نمونه خون هپارینه از پنج مورد گاو مبتلا به ورم پستان (باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* از آن‌ها جدا شد) و از پنج مورد گاو سالم در دو لوله استریل و در هر لوله به میزان پنج میلی‌لیتر گرفته شد. یکی از نمونه‌های خون در هر مورد به منظور جدا سازی نوتروفیل و نمونه دیگر به منظور جدا سازی مونوسیت استفاده شد (۱۲).

جدا سازی نوتروفیل‌ها

نوتروفیل‌ها با استفاده از داروی مگلومین[۳] (۱۰ گرم سدیم دیاتریزوات، ۶۶ گرم مگلومین دیاتریزوات و ۳۷ گرم ید در ۱۰۰ میلی‌لیتر محلول (دارو پخش – تهران) جدا سازی شد. به این ترتیب که مقدار پنج میلی‌لیتر خون هپارینه به نسبت ۱:۱ با سرم فیزیولوژی ۰/۹ در صد رقیق شد. مگلومین به نسبت ۳:۱ (سه میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی و یک میلی‌لیتر مگلومین) در سه لوله مجزا مخلوط شد و به طور کامل ورتکس شد. سپس، با استفاده از سمپلر دو میلی‌لیتر خون رقیق شده به آهستگی و ملایمت به هر یک از لوله‌های حاوی مگلومین رقیق شده اضافه، لوله‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در ۲۵۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند. مایع رویی لوله‌ها تخلیه و سلول‌های باقیمانده با سرم فیزیولوژی ۰/۹ درصد همگن شد و محتویات سه لوله در یک لوله استریل جمع‌آوری شد. ۰/۵ میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی ۰/۹ درصد به لوله اضافه شد و چندبار عمل پیپتینگ انجام شد. سپس با استفاده از ۲۰ میلی‌لیتر آب مقطر سرد گلبول‌های قرمز لیز شد و بلافاصله ۱۰ میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی ۲/۵۵ درصد اضافه و به مدت پنج دقیقه در ۲۵۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. مایع رویی لوله تخلیه و سلول‌های

باقیمانده با دکستروز پنج درصد به حجم یک میلی‌لیتر همگن شد. تعداد و زنده مانی نوتروفیل‌ها با استفاده از رنگ تریپان بلو تعیین شد (۱۳).

جدا سازی مونوسیت‌ها

به منظور جداسازی مونوسیت‌ها، ابتدا سلول‌های تک هسته‌ای نمونه‌های خون به شکل زیر جداسازی شد. هم حجم خون گرفته شده، محیط کشت RPMI 1640 اضافه شد و خون رقیق شد و به آهستگی بر روی پنج میلی‌لیتر هیستوپک (سیگما– ایالات متحده امریکا۱۰۸۳) اضافه شد به نحوی که دو فاز کاملاً جدا مشخص شود، سپس مجموعه فوق با سرعت ۲۰۰۰ تا ۲۵۰۰ دور در دقیقه به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. لایه مربوط به سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی[۴] از فاز میانی با استفاده از پیپت پاستور و پوار در زیر هود جمع آوری و به درون لوله فالکون تیوپ استریل انتقال داده شد سپس هم حجم سلول‌ها، محیط کشت RPMI 1640 اضافه و به منظور حذف هیستوپک و پلاکت به ترتیب یک بار با سرعت ۲۰۰۰ دور در دقیقه و بار دیگر با سرعت ۱۰۰۰ دور در دقیقه، هرکدام به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد.

در مرحله بعد، مایع رویی تخلیه و پس از بهم زدن یک میلی‌لیتر محیط کشت RPMI اضافه شد. تعداد و زنده مانی مونوسیت‌ها با استفاده از رنگ تریپان بلو تعیین شد (۱۴).

تهیه عوامل مترشحه *استافیلوکوکوس اورئوس*

دو لوپ از باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* (ATCC23219) که قبلاً در محیط کشت مانیتول سالت آگار کشت داده شده بود در Assay medium (۳۰ میلی‌لیتر محیط کشت RPMI ۱۶۴۰، FBS٪5 و ۱٪ L-glutamine) کشت و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶ تا ۱۲ ساعت انکوبه شد. لوله کشت در ۳۵۰۰ دور در هر دقیقه به مدت پنج دقیقه در دمای ۱۵ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد. مایع رویی جمع آوری و میزان پروتئین موجود در آن به روش براد فورد تعیین و تا زمان استفاده در فریزر منفی ۲۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد (۱۵).

سنجش میزان پروتئین به روش برادفورد

سنجش میزان پروتئین به روش برادفورد با استفاده از کیت شرکت بیورد[۵] و بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده کیت انجام شد. به این ترتیب که ابتدا رقت‌های سریال یک تا ۱/۱۶ از محلول استاندارد کیت تهیه شد. ۱۰۰میکرولیتر از هر رقت در یک لوله ریخته و پنج میلی‌لیتر محلول رنگی رقیق شده (۲۰ میلی‌لیتر محلول رنگی کیت و ۸۰ میلی‌لیتر آب دیونیزه) به آن اضافه شد. لوله‌ها ورتکس و جذب نوری آن‌ها در عرض پنج دقیقه تا یک ساعت در طول موج ۵۹۵ نانومتر خوانده شد. منحنی استاندارد بر اساس جذب نوری بدست آمده رسم شد، سپس غلظت پروتئین موجود در عوامل مترشحه به ترتیب ذکر شده و بر اساس منحنی استاندارد به میزان ۴۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر تعیین شد.

سنجش میزان زنده مانی نوتروفیل‌ها

به منظور سنجش میزان تأثیر عوامل مترشحه بر زنده مانی نوتروفیل‌ها، به روش فلوسیتومتری کشت از نوتروفیل‌ها و عوامل مترشحه از باکتری تهیه شد. ابتدا تعداد نوتروفیل‌ها در هر میلی‌لیتر به میزان 5×10^5 تنظیم شد. در یک میکروپلیت ۶ چاهک، چهار چاهک برای آزمایش و دو چاهک برای کنترل انتخاب شد. در چاهک‌های شماره یک تا چهار محیط کشت RPMI و ۵۰ میکرولیتر نوتروفیل با تراکم سلولی 5×10^5 به ترتیب همراه با غلظت‌های ۴۰۰، ۸۰۰، ۱۲۰۰ و ۱۶۰۰

میکروگرم در میلی‌لیتر از عوامل مترشحه اضافه شد. به‌طوری‌که حجم چاهک‌ها با تغییر میزان محیط RPMI در ۲۰۰ میکرولیتر تنظیم شد.همچنین در هر یک از چاهک‌های پنج (چاهک کنترل نوتروفیل بدون رنگ آمیزی) و ۶ (کنترل نوتروفیل با رنگ آمیزی) ۵۰ میکرولیتر نوتروفیل با تراکم سلولی ۵×۱۰^{۵} و ۱۵۰ میکرولیتر محیط کشت RPMI ریخته و سپس میکروپلیت به مدت سه ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و پنج در صد دی‌اکسیدکربن انکوبه شد.

رنگ آمیزی با Annexin/PI

پس از اتمام دوره انکوباسیون، محتویات هر یک از چاهک‌ها در فالکون‌های جداگانه ۱۵ میلی‌لیتری ریخته شد. لازم به ذکر است که قبل از آن برروی آن‌ها شماره چاهک (نمونه) درج شده بود. پس از آن، لوله‌های فالکون در ۱۲۰۰ دور در هر دقیقه به مدت ۸ دقیقه سانتریفیوژ و مایع رویی خارج شد. ۱۰۰ میکرولیتر ABB[۶] (۲/۶ گرم HEPES، ۸/۱۸ گرم NaCl و ۰/۲۸ گرم $CaCl_2$ در یک لیتر آب) به هر لوله اضافه شد. با چند بار پیپتیگ محتویات لوله‌ها به شکل سوسپانسیون در آمد. محلول Annexin آماده، به هر کدام به میزان ۵۰ میکرولیتر اضافه و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای آزمایشگاه در تاریکی انکوبه شد. لوله‌ها در ۱۲۰۰ دور در هر دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه در دمای چهار درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ و مایع رویی آن‌ها به آرامی خارج شد.

به هر کدام از لوله‌ها ۲۰۰ میکرولیتر ABB اضافه شد. در آخرین مرحله به تمام لوله‌ها به استثنا لوله شماره پنج (کنترل نوتروفیل بدون رنگ آمیزی)، ۲۰ میکرولیتر پروپیدیوم آیداید[۷] (سیگما - آمریکا) اضافه شد. به هر یک از لوله‌ها ۱/۵ میلی‌لیتر بافر فاکس (۰/۱ گرم سدیم آزاید،یک گرم BSA و ۰/۲ گرم EDTA در ۱۰۰میلی‌لیتر PBS) اضافه و نتایج توسط فلوسیتومتری (شرکت Partec – آلمان و نرم افزار FlowMax) خوانده شد (۳۱).

سنجش میزان زنده مانی مونوسیت‌ها

سنجش میزان تأثیر عوامل مترشحه بر زنده مانی مونوسیت‌ها با استفاده از میکروسکوپ فلورسانس انجام شد. به این ترتیب که کشت توام مونوسیت و عوامل مترشحه از باکتری به عمل آمد. به هر فلاسک کشت T25 تعداد ۱۰×۱۰^{۶} سلول تک هسته‌ای خون محیطی ریخته شده به مدت دو ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و پنج در صد دی اکسید کربن انکوبه شد.

سلول‌های غیر چسبنده جدا و مونوسیت‌های چسبنده به تعداد تقریبی ۱۰×۱۰^{۵} در فلاسک باقی ماند. عوامل مترشحه با غلظت نهایی ۴۰۰، ۸۰۰، ۱۲۰۰ و ۱۶۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر به فلاسک اضافه و به مدت یک ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و پنج در صد دی‌اکسیدکربن انکوبه شد.

پس از اتمام دوره انکوباسیون ۶۰ دقیقه ای، نمونه‌ها باAcridine Orange به میزان 10µl/ml PBS و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و پنج در صد دی‌اکسیدکربن رنگ آمیزی شد. پس از شستشو باPBS ۱۰ میکرولیتر پروپیدیوم آیداید (PI) (شرکت سیگما- آمریکا) اضافه شد و به مدت پنج دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و پنج درصد دی اکسید کربن انکوبه شد (۳۱).

در آخرین مرحله پس از شستشو با PBS، تعداد یک صد سلول شمارش و سلول‌های زنده، آپوپتوز اولیه، آپوپتوز تأخیری و نکروز شده به شرح جدول ۱ تعیین شد.

جدول ۱- مقایسه سلول‌های زنده، آپوپتوز اولیه، آپوپتوز تاخیری و نکروز

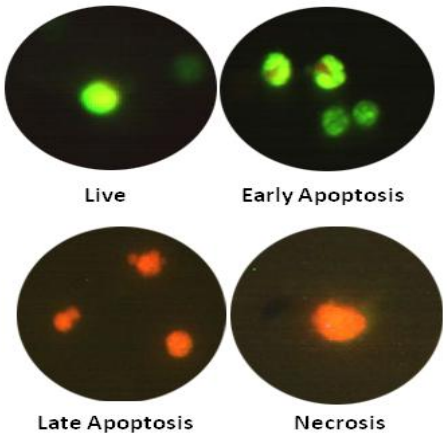
PI (پروپیدیوم آیداید)	AO (آکریدین اورنج)	نوع سلولی
منفی	مثبت و هسته طبیعی	زنده
منفی	مثبت و هسته متراکم	آپوپتوتیک اولیه
مثبت	مثبت و هسته متراکم	آپوپتوتیک نهایی
مثبت	مثبت و هسته متورم	نکروتیک

تحلیل آماری

نتایج این مطالعه با برنامه Graph Pad Prism Software (version 5.03. Graph Pad Software Inc. San Diego, California) تفسیر و بررسی شد. مقایسه بین گروه‌ها توسط paired t-test انجام شده، مقدار $p<۰/۰۵$ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

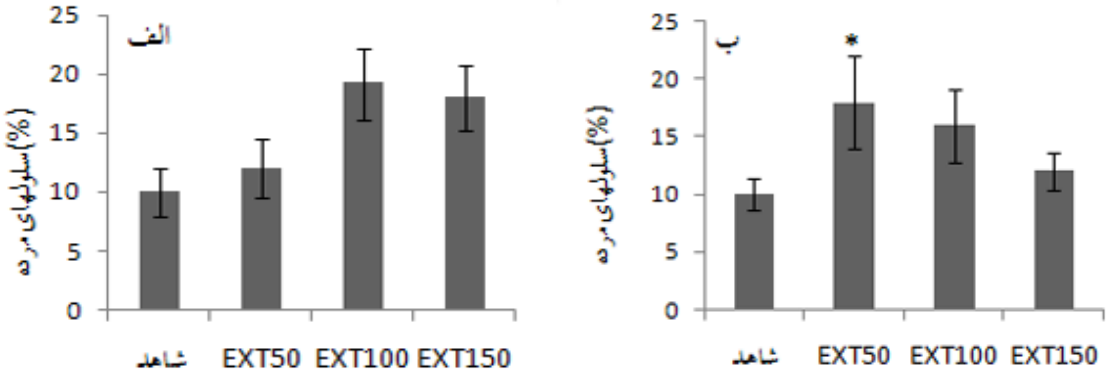
نتایج

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که عوامل مترشحه از باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* ATCC 23219 بر مونوسیت‌ها ونوتروفیل‌ها در گاوان سالم و بیمار تأثیرات متفاوتی دارد. مراحل مختلف آپوپتوز در مونوسیت‌های جدا شده از خون محیطی گاوان سالم و بیمار با استفاده از رنگ اکریدین اورنج و پروپیدیوم آیداید بررسی شد (شکل ۱).



شکل ۱- بررسی آپوپتوز القا شده در مونوسیت‌های جدا شده از خون محیطی گاوان مبتلا به ورم پستان توسط عوامل مترشحه از باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* ATCC 23219 با استفاده از رنگ آکریدین اورنج و پروپیدیوم آیداید.

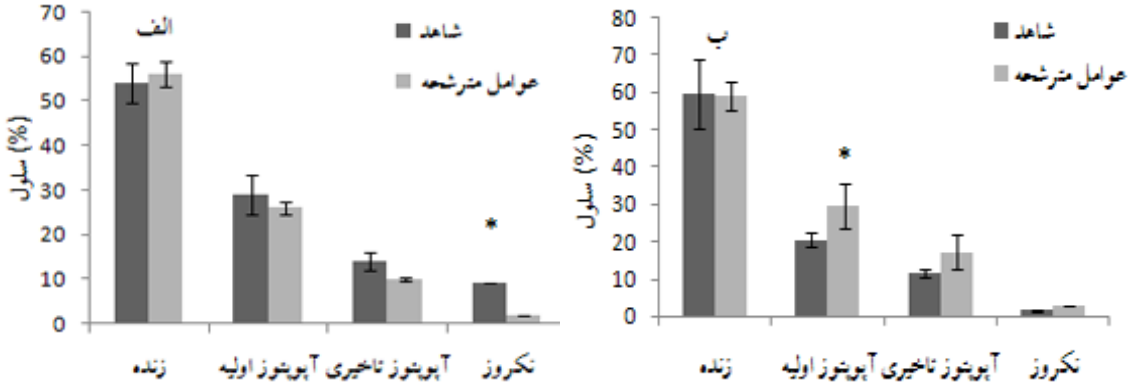
نتایج حاصل از تأثیر عوامل مترشحه از باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* ATCC 23219 بر زنده مانی نوتروفیل‌ها و مونوسیت‌های جدا شده از گاوان سالم و مبتلا به بیماری ورم پستان نشان داد که در مورد گاوان سالم عوامل مترشحه حاوی ۸۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر پروتئین (EXT100) و در مورد گاوان مبتلا به بیماری ۴۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر پروتئین (EXT50) بیشترین مرگ سلولی مونوسیت‌ها و نوتروفیل‌ها را داشته است (شکل ۲).



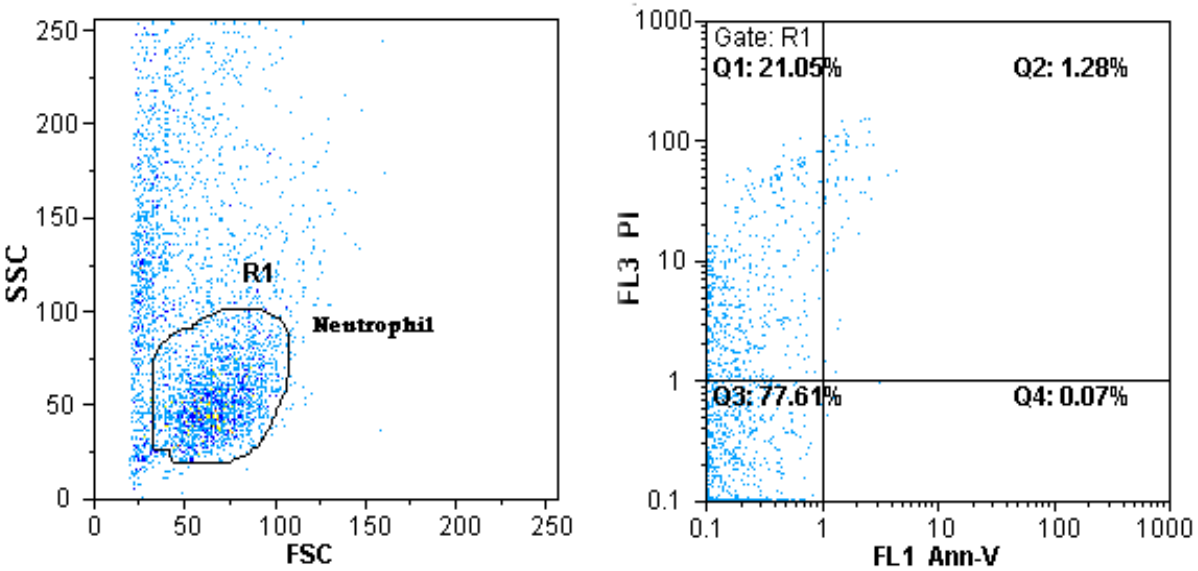
شکل ۲- نمودار میزان مرگ مونوسیت‌های خون محیطی گاوان سالم (الف) و مبتلا به بیماری ورم پستان ناشی از *استافیلوکوکوس اورئوس* (ب) تحت تأثیر غلظت‌های مختلف عوامل مترشحه از باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* ATCC 23219.

بررسی مراحل مختلف آپوپتوز در مونوسیت‌ها و نوتروفیل‌های گاوان سالم و مبتلا به بیماری نشان داد که حضور عوامل مترشحه در گاوان سالم موجب کاهش آپوپتوزدر مونوسیت‌ها و در گاوان بیمار موجب افزایش آپوپتوز در آن‌ها شد. یعنی مونوسیت‌های گاوان مبتلا حساسیت بیشتری نسبت به عوامل مترشحه از باکتری نشان دادند و مرگ آن‌ها از طریق آپوپتوز انجام گرفته و میزان آپوپتوز در گاوان مبتلا بیشتر است (شکل۳).

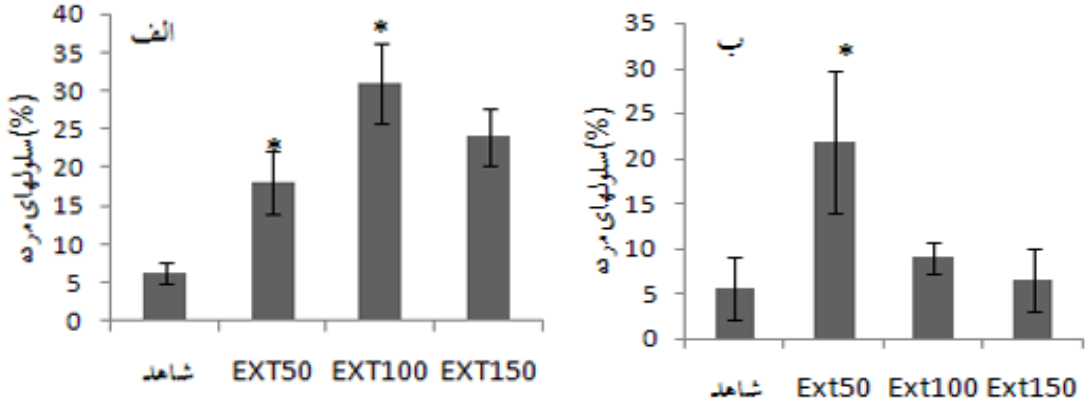
نتایج فلوسیتومتری سنجش میزان آپوپتوز درنوتروفیل‌های گاوان مبتلا به ورم پستان ناشی از *استافیلوکوکوس اورئوس* نیز در شکل ۴ آمده است



شکل۳- نمودار میزان آپوپتوژ اولیه، آپوپتوز تاخیری و نکروز القا شده در مونوسیت‌های گاوان سالم (الف) و مبتلا به بیماری ورم پستان ناشی از *استافیلوکوکوس اورئوس* (ب) توسط غلظت‌های مختلف عوامل مترشحه از باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* ATCC 23219.



شکل ۴- نمونه‌ای از نمودار فلوسیتومتری سنجش میزان آپوپتوزدر نوتروفیل‌های گاوان مبتلا به ورم پستان ناشی از *استافیلوکوکوس اورئوس*. مثبت بودن رنگ‌های Ann-V/PI بر اساس گیت نوتروفیل‌ها ارزیابی شده است.

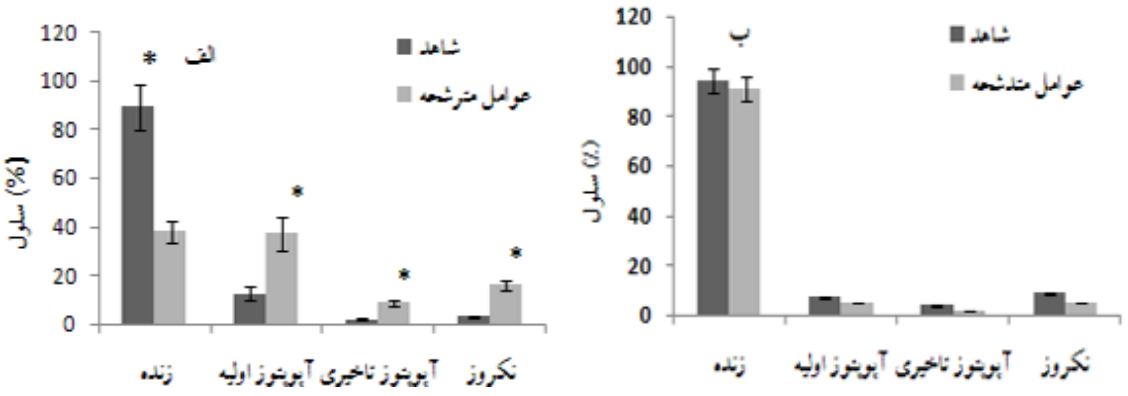


شکل ۵- میزان مرگ نوتروفیل‌های خون محیطی گاوان سالم (الف) و مبتلا به بیماری ورم پستان استافیلوکوکی (ب)تحت غلظت‌های مختلف عوامل مترشحه از باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* ATCC 23219 .

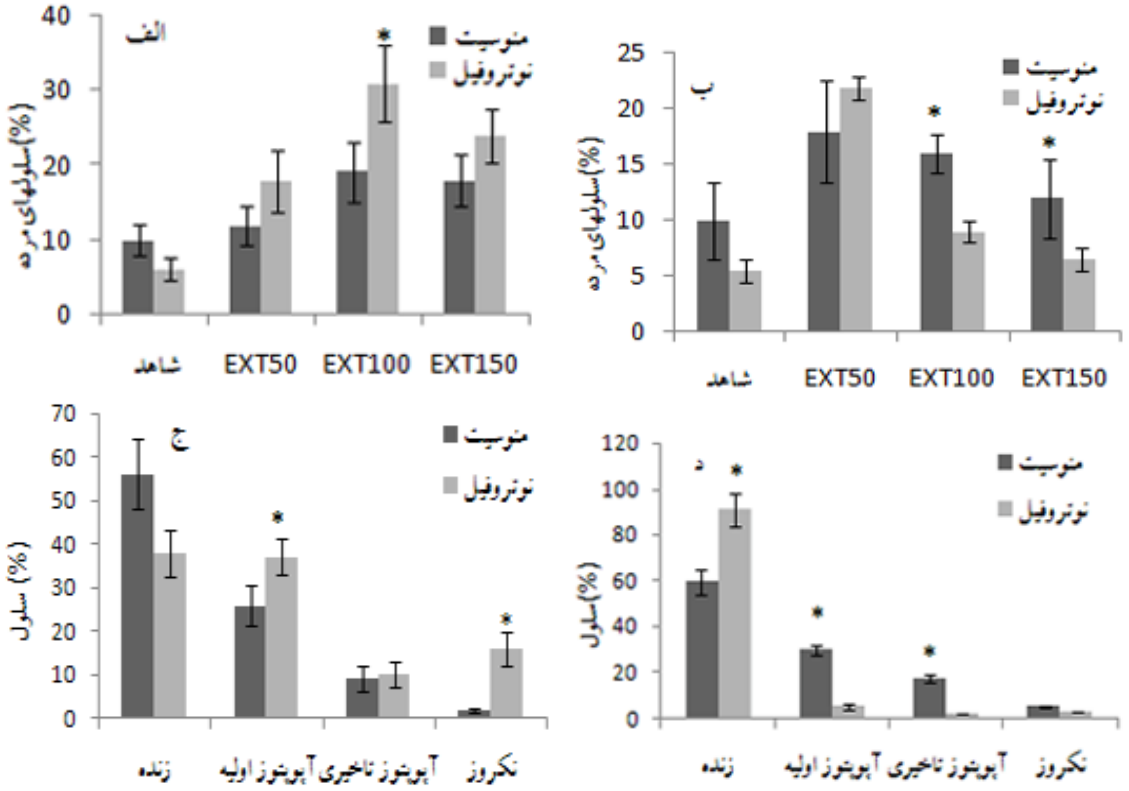
میزان مرگ نوتروفیل‌های خون محیطی در گاوان سالم و مبتلا به ورم پستان ناشی از *استافیلوکوکوس اورئوس* در اثرعوامل مترشحه آن در شرایط کشت در شکل ۵ آمده است.

در مورد آپوپتوز اولیه، تأخیری و نکروز، حضور عوامل مترشحه در نوتروفیل‌های گاوان سالم موجب افزایش آپوپتوز و نکروز و در مورد نونروفیل‌های گاوان بیمار باعث کاهش آپوپتوز آن‌ها شده است. یعنی نوتروفیل‌های گاوان سالم حساسیت بیشتری نسبت به عوامل مترشحه نشان داده اند و میزان آپوپتوز و نکروز در گاوان سالم بیشتر است (شکل ۶)

مقایسه میزان مرگ سلولی و آپوپتوز در مونوسیت‌ها و نوتروفیل‌های گاوان سالم و مبتلا به ورم پستان در شکل ۷ آمده است.



شکل۶- میزان آپوپتوز اولیه، آپوپتوز تاخیری و نکروز القا شده در نوتروفیل‌های گاوان سالم (الف) و مبتلا به بیماری ورم پستان ناشی از *استافیلوکوکوس اورئوس* (ب) توسط غلظت‌های مختلف عوامل مترشحه از باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* ATCC 23219 .



شکل ۷- مقایسه میزان مرگ سلولی وآپوپتوز در مونوسیت‌ها و نوتروفیل‌های گاوان سالم و مبتلا به ورم پستان ناشی از *استافیلوکوکوس اورئوس* که تحت تأثیر عوامل مترشحه از باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* ATCC 23219 قرار گرفته اند. مقایسه میزان مرگ سلولی در مونوسیت‌ها و نوتروفیل‌های گاوان سالم (الف)، مقایسه میزان مرگ سلولی در مونوسیت‌ها و نوتروفیل‌های گاوان بیمار (ب)، مقایسه میزان آپوپتوز در مونوسیت‌ها و نوتروفیل‌های گاوان سالم (ج)و مقایسه میزان آپوپتوز در مونوسیت‌ها و نوتروفیل‌های گاوان بیمار (د).

در نهایت وقتی گاوان به بیماری ورم پستان *استافیلوکوکوس اروئوس* مبتلا می‌شوند، عوامل مترشحه از این باکتری تأثیر بیشتری روی مونوسیت‌ها نسبت به نوتروفیل‌ها دارند.

بحث

استافیلوکوکوس اورئوس یکی از مهم‌ترین عوامل ایجاد کننده ورم پستان در گاو محسوب می‌شود. این باکتری به منظور ایجاد تورم پستان باید از طریق مجرای سر پستانک وارد غده پستان شده و با ایجاد اختلال در عملکرد سیستم ایمنی ذاتی و اکتسابی مکانیسم‌های دفاعی غده پستانی را تحت تأثیر قرار دهد (۱۶).

این عمل به واسطه یک سری عوامل حدت انجام می‌شود. این عوامل در دیواره سلولی باکتری قرار داشته و یا به شکل پروتئین‌های خارج سلولی (اگزو پروتئین‌ها) ترشح می‌شوندکه شامل کپسول (۱۷)، پپتیدوگلیکان، اسیدهای تیکوئیک، آگلوتینوژن‌ها، پروتئین A، عامل جمع کننده (کوآگولاز متصل[1]) (۱۸)، استافیلوکوآگولاز، استافیلوکیناز، هیالورونیداز (۱۹)، همولیزین‌ها (α،β،γ،δ)، لکوسیدین‌ها (۲۰)،

توکسین‌های اکسفولیاتیو(A، B)، پیگمان‌های متصل به سلول[۸] به‌نام کارتنوئید، انتروتوکسین‌ها (SEA-SEI) و توکسین-۱ سندرم شوک توکسیک (TSST-1) می‌باشند (۲۱).

از این رو در مطالعه حاضر، تأثیرعوامل مترشحه از باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* ATCC 23219 که پس از کشت در محیط آزاد می‌شوند بر روی زنده مانی دو سلول مهم سیستم ایمنی یعنی نوتروفیل‌ها و مونوسیت‌ها بررسی شد. به این ترتیب که نوتروفیل‌ها و مونوسیت‌ها در مجاورت غلظت‌های مختلف عوامل مترشحه قرار گرفته، میزان مرگ سلولی به روش آپوپتوز و نکروز با استفاده از رنگ‌های Annexin V و PI، دستگاه فلوسیتومتری و روش ایمنوفلورسانس سنجش شد. نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که در مورد مونوسیت‌های گاوان سالم و بیمار به ترتیب غلظت ۸۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر(EXT100) و غلظت ۴۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر(EXT50) از عوامل مترشحه باعث بیشترین مرگ سلولی شدند. از طرفی، حضور عوامل مترشحه بر روی مونوسیت‌های گاوان بیمار در مقایسه با مونوسیت‌های گاوان سالم تأثیر بیشتری بر القا آپوپتوز داشت.

در مورد نوتروفیل‌ها نیز همانند مونوسیت‌ها در گاوان سالم غلظت بیشتر و در گاوان بیمارغلظت کمتر عوامل مترشحه باعث بیشترین مرگ سلولی می‌شدند. ولی در مورد آپوپتوز بر خلاف مونوسیت‌ها، حضور عوامل مترشحه آپوپتوز بیشتری را در نوتروفیل‌های گاوان سالم در مقایسه با گاوان مبتلا القا نمود.

نتایج این مطالعه نشان داد که هم در گاوان سالم و هم بیمار میزان مرگ نوتروفیل‌ها در حضور عوامل مترشحه از باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* ATCC 2321 در مقایسه با مونوسیت‌ها بیشتر است (شکل ۷ الف و ب). از نظر تأثیر عوامل مترشحه بر میزان آپوپتوز، مقایسه بین گاوان سالم و بیمار نشان داد که میزان آپوپتوز نوتروفیل‌ها در گاوان سالم بیشتر از مونوسیت‌ها است ولی این پدیده در مورد گاوان بیمار بر عکس است. یعنی در گاوان بیمار در حضور عوامل مترشحه مونوسیت‌ها بیشتر از نوتروفیل‌ها دچار آپوپتوز می‌شوند.

عوامل متعددی از جمله آنچه در بالا به آن‌ها اشاره شد، در عوامل ترشح شده از *استافیلوکوکوس اورئوس* وجود دارند که باعث مرگ سلول‌های خونی اعم از مونوسیت‌ها و نوتروفیل‌ها چه از طریق نکروز و چه از طریق آپوپتوز می‌شوند (۲۲).

یکی از عوامل مهم موجود در ترشحات باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس*، لکوسیدین‌ها هستند که علاوه بر اثرات زیستی، موجب مهار پاسخ ایمنی بر علیه این باکتری می‌شوند. مطالعات به عمل آمده نشان می‌دهد هر چند لکوسیدین مترشحه از *استافیلوکوکوس اورئوس* قادر به القا آپوپتوز در نوتروفیل‌های انسانی هستند، در دوز بالا باعث مرگ سلولی به روش نکروز می‌شوند (۲۳).

مطالعات انجام شده نشان می‌دهد نه تنها *استافیلوکوک‌ها* بلکه اگزوتوکسین مترشحه از *پاستورلاها* نیز باعث مرگ سیستمیک ماکروفاژها و نوتروفیل‌ها از طریق آپوپتوز و نکروز ثانویه می‌شوند (۲۴).

عامل دیگری که در ترشحات *استافیلوکوک‌ها* یافت می‌شود Panton-Valentine Leukocidin (PVL) است که در غلظت پایین باعث آپوپتوز و در غلظت بالا باعث نکروز نوتروفیل‌ها می‌شود (۲۵ و ۲۶). PVL

استافیلوکوکوس اورئوس یک عامل سیتوتوکسیک بسیار قوی برای نوتروفیل‌های انسان است (۲۵).

پدیده ای که در این مطالعه نیز مشاهده شد، شاید به همین خاطر است که گفته می‌شود آپوپتوز در مونوسیت‌ها و نوتروفیل‌های گاوان مبتلا به ورم پستان *استافیلوکوکی* یا *اشریشیا کلی* تسریع می‌شود (۲۷ و ۲۸).

Phenol-Soluble modulin (PSM) ماده دیگری از ترشحات *استافیلوکوک‌ها* است که باعث القا آپوپتوز خود بخودی مونوسیت‌ها و نوتروفیل‌ها می‌شود (۲۸، ۲۹ و ۳۰). البته میزان القا آپوپتوز به مدت زمان سنجش آن پس از بر خورد با عوامل مترشحه نیز بستگی دارد؛ به‌طوری که گفته می‌شود در طی ۳۶ ساعت LPS باعث کاهش آپوپتوز و افزایش تعداد نوتروفیل‌های زنده می‌شود. علاوه بر این، در صد سلول‌های نکروز شده از ۹ به ۳۰ درصد افزایش می‌یابد (۳۱). مقاومت در برابر القا آپوپتوز به شرایط سلولی نیز بستگی دارد به طوری که حرارت دادن مونوسیت‌ها از طریق القا HSP72 باعث مقاومت آن‌ها در برابر آپوپتوز القا شده به وسیله *استافیلوکوکوس اورئوس* می‌شود (۳۲).

در مورد مکانیسم القا آپوپتوز توسط ترشحات *استافیلوکوکوس اورئوس* در سلول‌های سیستم ایمنی به خصوص نوتروفیل‌ها و مونوسیت‌ها نظریات متفاوتی بیان می‌شود از جمله این‌که گفته می‌شود این باکتری از طریق فعال سازی کاسپازهای ۶ و ۹ (۲۷) و یا القا ترشح FasL در سرم یا سطح سایر سلول‌ها باعث القا آپوپتوز در مونوسیت‌ها و نوتروفیل‌ها می‌شود (۳۳). آن‌چه از یافته‌های سایر مطالعات و تحقیق حاضر بر می‌آید این است که، ترشحات *استافیلوکوکوس اورئوس* باعث القا آپوپتوز و تا حدودی نکروز هم در نوتروفیل‌ها و هم در مونوسیت‌های گاوان سالم و بیمار می‌شود. ولی این سلول‌ها در گاوان بیمار نسبت به مرگ سلولی حساس‌تر از گاوان سالم هستند از طرفی در گاوان سالم نوتروفیل‌ها و در گاوان بیمار مونوسیت‌ها نسبت به مرگ سلولی حساس‌ترند. بنابراین، به نظر می‌رسد در گاوان بیمار نوتروفیل‌ها مقاومت بیشتری از خود در مقابل آپوپتوز القا شده نشان می‌دهند. آنچه مسلم است تعیین دقیق محتویات ترشحات باکتری و نیز مکانیسم عمل آن‌ها به روشن شدن مطلب کمک خواهد کرد.

References:

(1) Sordillo LM, Streicher KL. Mammary gland immunity and mastitis susceptibility. *Mammary Gland Biology and Neoplasia* 2002; 7 (2): 135-46.

(2) Hornef MW, Wick MJ, Rhen M, Normark S. Bacterial strategies for overcoming host innate and adaptive immune responses. *Nat Immunol* 2002; 3(11): 1033-40.

(3) Marechal C, Seyffert N, Jardin J, Hernandez D, Jan D, Rault L, et al. Molecular basis of virulence in *staphylococcus aureus* mastitis. *PLOS ONE* 2011; 6(11): e27345.

(4) Watts JL. Etiological agents of bovine mastitis. *Vet Microbial* 1988; 16(1): 41-66.

(5) Watts JL, Pankey J W, Oliver W M, Nickerson S C, Lazarus AW. Prevalence and effects of mastitis in beef cows. *Anim. Sci* 1986; 62(1): 16-20.

(6) Biberstein E, Hirsh D. *Staphylococcuses.* In: Songer JG, Post KW, Veterinary Microbiology. 1st ed, UK: Blackwell Science; 2005. P 115-26.

(7) Aarestrup FM, Scott NL, Sordillo LM. Ability of *Staphylococcus aureus* coagulase genotypes to resist neutrophil bactericidal activity and phagocytosis *American Society for Microbiology* 1994; 62(12): 5679-82.

(8) Newbould FHS, Neave FK. The recovery of small numbers of *Staphylococcus aureus* infused into the bovine cistern. *Dairy Res* 1965; 32: 157-62.

(9) Nickerson SC. Immunological aspects of mammary involution. *Dairy sci* 1989; 72: 1665-78.

(10) Loeb L. The influence of certain bacteria on the coagulation of theblood. *Med Res Inst.*1993; 10: 407-19.

(11) Kurjogi MM, Kaliwal BB. Prevalence and antimicrobial susceptibility of bacteria isolated from bovine mastitis. *Advances in Applied Science Research* 2011; 2(6): 229-35.

(12) MorRis DD. Collection and submission of samples for cytologic and hematologic studies. In: Smith BP. Large animal internal medicine. 3th ed. USA: Mosby Inc; 2002. P 413-414.

(13) Rezapour A, Majidi J. An Improved Method of Neutrophil Isolation in Peipheral Blood of Sheep. *Animal and Veterinary Advances* 2009; 8(1): 11-5.

(14) Hay FC, Westwood OMR. Isolation of cells. In: Practical Immunology. 4th ed. UK: Blackwell Science; 2002. P 179-202.

(15) Mullarky IK, Su C, Frieze N, Park YH, Sordillo LM. *Staphylococcus aureus* agr genotypes with entrotoxin production capabilities can resist neutrophil bactericidal activity. *infection and immunity* 2001;69(1): 45-51.

(16) Bien J, Sokolova O, Bozko P. Characterization of virulence factors of *Staphylococcus areus* : Novel function of known virulence factors that are implicated in activation of airway epithelial proinflammatory response. *Pathogen*s 2011; 1(2):10(3):2-16.

(17) Riodan KO, Lee JC. *Staphylococcus aureus* capsular polysaccharides. *Clin Microbial. Reviews* 2004; 17(1): 218-34.

(18) Evelyn J, Walsh HM, Oleg V, Gorkun T, Foster J. Identification of the *Staphylococcus areus* MSCRAMM clumping factor B (CIfB) binding site in the ac-domain of human fibrinogen. *Molecular microbiology* 2007; 154(2): 550-58.

(19) Coulter SN, Schwan WR, Ng EY, Langhorne MH, Ritchie HD, Westbrockwadman S, Hufnagle WO, Folger KR, Bayer AS, Stover CK. *Staphylococcus areus* genetic loci impacting growth and survival in multiple infection environments. *Molecular Microbiology* 1998; 30: 393-404.

(20) Gravet A, Colin DA, Keller D, Giradot R, Monteil H, Prevost G. Characterization of a novel structural member, LukE-LukD, of the bi-component Staphyloco ccal leucotoxins family. *FEBS letters* 1998; 465: 202-8.

(21) Dinge MM, Orwin PM, Schlievert PM. Exotoxins of *Staphylococcus areus*. *Clinical microbiology reviews* 2000; 13: 16-34.

(22) Yamamoto CH, Yoshida S I, Taniguchi H, Qin MH, Maymoto H, Mizuguchi Y. Lipopolysaccharide and granulocyte colony-stimulating factor delay neutrophil apoptosis and ingestion by guinea pig macrophages. *Infect. Immun* 1993; 61(3): 1972-79.

(23) Genestier AL, Michallet MC, Prévost G, Bellot G, Chalabreysse L, Peyrol S, et al. *Staphylococcus areus* Panton-Valentine leukocidin directly mitochondria and induces Bax-dependent apoptosis of human neutrophils. *Clin Invest* 2005; 115: 3117-27.

(24) Vale AD, Costa-Ramos C, Silva ASP, Silva D, Gartner FMS, dos Santos NT, Silva M. Systemic macrophage and neutrophil destruction by secondary necrosis induced by a bacterial exotoxin in a Gram-negative septicemia. *Cellular Microbiology* 2007; 9(7): 988-1003.

(25) Loffler B, Hussain M, Grundmeier M, Bruck M, Holzinger D, Varga G, et al

Staphylococcus areus panton-valentine leukocidin is a very potent cytotoxic factor for human neutrophils. *Plos Pathogens* 2010; 6(1): 1-12.

(26) Fox S, Leitch AE, Duffin R, Haslett C, Rossi AG. Neutrophil apoptosis: Relevance to the Innate Immuno Response and Inflammatory Disease. *Innate Immun* 2010; 2: 216-27.

(27) Wang JH, Niu HY, Zhang M, He Ping, Zhang Y, Kan L. Apoptosis induced by *Staphylococcus arureus* in human monocytic U937 cells involves Akt and mitogen-activated protein (MAPK) phosphorylation. *Biotechnology* 2011; 10 (21): 4318-27.

(28) Tharwat M. Accelerated neutrophil apoptosis in cows affected with acute Mastitis. *Agricultural and Veterinary Sciences* 2011;4(2): 125-34.

(29) Weinrauch Y, Zychlinsky A. The induction of apoptosis by bacterial pathogens. *Annu Rev Microbiol* 1999; 53: 155-87.

(30) Liles WC, Thomsen RO, Mahony DS, Klebanoff SJ. Stimulation of human neutrophils and monocytes by Staphylococcal phenol-soluble modulin. *Leu. Bio* 2001; 70: 96-102.

(31) Turina M, Miller FN, Mchugh PP, Cheadle WG, Polk JrH. Endotoxin inhibits apoptosis but induces primary necrosis in neutrophils. *Inflammation* 2005; 29(1): 55-63.

(32) Guzik K, Bzowska M, Dobrucki J, Pryjma, J. Heat-shocked monocytes are resistant to *Staphylococcus arureus*-induced apoptotic DNA fragmentation due to expression of HSP72. *Infection and immunity* 1999; 67(8): 4216-22.

(33) Nwakoby IE, Reddy K, Patel P, Shah N, Sharma S, Bhaskaran M. Fas-Mediated Apoptosis of Neutrophils in Sera of Patients with Infection. *Infection and immunity* 2001; 69 (5): 3343-3349.

---

[1]. Microbial surface components adhesive matrix molecules recognizing
[2]. Californi Mastitis Test
[3]. Meglumin
[4]. Periphral mononuclear cells
[5]. Bio Rad KIt
[6]. Annexin binding buffer
[7]. Propedium iodide
[8]. Cell bound pigment

The effect of *Staphylococcus aureus* extraction factors on viability of neutrophils and monocytes *in vitro*

Nahideh Afzal Ahangaran *
Ph.D student of Immunology, Urmia University, Urmia, Iran, n.a.ahangran@gmail.com
Nouroz Delirezh
Assistant Professor of Immunology, Urmia University, Urmia, Iran, n.delirezh@urmia.ac.ir
Malahat Ahmadi
Associate Professor of Microbiology, Urmia University, Urmia, Iran, m.ahmadi@urmia.ac.ir

Abstract

Introduction: *Staphylococcus aureus* exoproteins are known to have potent effects on cells of the immune system in human infections and their primary inhibitory effects *in vivo* on innate immune responses. The objective of this study was to determine the effects of bacterial extractions on viability of neutrophils and monocytes in the healthy and the infected cattle (mastitis).

Materials and Methods: In order to isolate of neutrophils and monocytes, heparinized blood samples were taken from the healthy (n=5) and the infected cattles (n=5). Neutrophil and monocyte isolation was carried out using meglumine and histopaque compounds respectively. Secretory factors from *Staphylococcus aureus* ATCC23219 were extracted and its concentration assayed by Bradford method and were determined to be 400 µg/ml. The effect of different concentrations of the extract on viability of neutrophils and monocytes was determined by flowcytometery and immunoflorcent respectively.

Results: The results showed that in the healthy and the infected cattles, extract containing 800 and 400 µg/ml protein, respectively caused the most death in monocytes and neutrophils. It also seemed that in the infected cattles, monocytes were more sensitive to cell death than the neutrophils.

Discussion and Conclusion: The extract of *Staphylococcus aureus* induces apoptosis and necrosis in both neutrophils and monocytes of both the healthy and the infected cattle but the cells in the cattle with mastitis are more sensitive to apoptosis than in the non- infected cattles.

In the case of mastitis due to *Staphylococcus aureus*, the bacterial extracts effects on monocytes and not the neutrophils. However, determination of bacterial extraction fractions and their effect on immune system cells are strongly recommended.

Key words: *Staphylococcus aureus*, Bacterial extraction factors, Neutrophil, Monocyte

* Corresponding Author
Received: October 20, 2012/ **Accepted:** December 29, 2012