

Гриценко В.А.\*, Гриценко Я.В.\*\*

\*Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза УрО РАН

\*\*ООО «Центр научного зондирования»

## ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ И АДАПТАЦИЯ СТАФИЛОКОККОВ К БАКТЕРИЦИДНОМУ ДЕЙСТВИЮ КАТИОННОГО БЕЛКА ЛЕЙКОЦИТОВ «ИНТЕРЦИДА»

В экспериментах *in vitro* установлено, что культуры *Staphylococcus aureus* менее чувствительны к бактерицидному действию катионного белка лейкоцитов человека «интерцида» (мол. масса 11,0-11,5 кД), чем коагулазоотрицательные стафилококки. Показаны адаптация стафилококков и повышение их устойчивости к «интерциду» при культивировании бактерий в МПБ с данным катионным белком (2 мг/мл) в течение трех пересевов.

**Ключевые слова:** *S. aureus*, коагулазоотрицательные стафилококки, катионный белок лейкоцитов, бактерицидность, адаптация

Катионные белки лейкоцитов (КБЛ) являются эффекторами кислороднезависимого киллинга бактерий и относятся к факторам неспецифической антибактериальной резистентности макроорганизма. Они способны высвобождаться из лизосом нейтрофилов и макрофагов при фагоцитозе и накапливаться в очагах воспаления [1]. Отсутствие у данных белков ферментативной (в частности, гидролазной и пептидазной) активности позволяет считать, что летальный эффект КБЛ в отношении бактерий определяется дестабилизацией клеточной стенки (в том числе цитоплазматической мембраны) и нарушением метаболизма микроорганизмов [2].

К этой группе факторов принадлежит выделенный из активированных лейкоцитов человека катионный термостабильный белок с молекулярной массой 11,0-11,5 кД, обладающий широким спектром антибактериальной активности и названный «интерцидом» [3]. Анализ чувствительности эшерихий к бактерицидному действию «интерцида» показал, что штаммы кишечной палочки, выделенные от больных с инфекционно-воспалительной патологией, более устойчивы к нему, чем культуры *Escherichia coli*, изолированные из фекалий здоровых людей и воды открытых водоемов [4]. Данное обстоятельство свидетельствует не только о внутривидовой вариабельности эшерихий по резистентности к «интерциду», но и о патогенетическом значении указанного свойства *E. coli* в развитии внекишечных эшерихиозов [5].

В этой связи интересным представлялось оценить меж- и внутривидовое разнообразие стафилококков по степени их чувствительности к бактерицидному действию «интерцида», а также проанализировать возможности стафи-

лококков адаптироваться к данному бактерицидному агенту. Выяснение этих вопросов будет способствовать пониманию патогенеза заболеваний стафилококковой этиологии, в развитии которых могут принимать участие как *Staphylococcus aureus*, так и коагулазоотрицательные стафилококки [6].

### Материал и методы

Исследования проведены на 51 музейном штамме *S. aureus* (n=27) и КОС разных видов (n=24) из коллекции ИКВС УрО РАН (д.б.н. О.Л. Карташова, к.м.н. Л.И. Паршута). В опытах использовали экспериментальный образец препарата «интерцида» (серия С2), полученный на базе Уфимского НИИВС им. И.И. Мечникова из полуфабриката жидкого человеческого лейкоцитарного интерферона методом селективной ультрафильтрации с применением мембранной технологии и представляющий собой сухой порошок желто-розового цвета, хорошо растворимый в воде.

Для определения чувствительности стафилококков к бактерицидному действию «интерцида» из суточных агаровых культур бактерий готовили взвеси (1 млрд. м.т./мл); в объеме 0,2 мл их вносили в 0,5 мл изотонического раствора NaCl, содержащего «интерцид» (концентрации 1-5 мг/мл), в контроле – «интерцид» отсутствовал; смеси инкубировали 20 мин при 37° С; затем в пробы заливали 2,5 мл мясopептонного бульона (МПБ); выдерживали их при 37° С в течение 5 часов; после чего с помощью фотоэлектрориметра (КФК-2,  $\lambda=540$  нм, кювета – 0,5 см) измеряли оптические плотности (OD, ус. ед.) исследуемых проб. Бактерицидный эффект «интерцида» в отношении стафилококков оценива-

ли по индексу бактерицидности (ИндБ, %), который рассчитывали по формуле  $\text{ИндБ} = \text{ODk} - \text{ODo} / \text{ODk} * 100\%$ , где  $\text{ODk}$  и  $\text{ODo}$  – оптические плотности взвесей в контроле и опыте [4].

В опытах по адаптации бактерий к «интерциду» стафилококки культивировали при 37°С в МПБ с «интерцидом» (2 мг/мл), в контроле – «интерцид» в МПБ не добавляли. Проведено 3 последовательных пассажа, при которых в 13,5 мл «свежего» МПБ вносили 1,5 мл взвеси стафилококков (концентрация – 1 млрд. м.т./мл), приготовленной из суточных опытных и контрольных культур путем их центрифугирования (3000 тыс. об/мин, 20 мин.) и замены культуральной жидкости на изотонический раствор NaCl. В процессе развития бульонных культур стафилококков периодически (до 6 ч. – каждые два часа и через 24 часа) с помощью КФК-2 производили замеры оптической плотности (ОД, ус. ед.) исследуемых проб, а также вычисляли удельную скорость роста бактерий ( $\mu_2 - \mu_{24}$ , ч<sup>-1</sup>) на отдельных этапах культивирования [7] и рассчитывали индекс их резистентности к «интерциду» (ИндР, %) по формуле  $\text{ИндР} = \text{ODo} / \text{ODk} * 100\%$ , где  $\text{ODk}$  и  $\text{ODo}$  – оптические плотности взвесей в контроле и опыте [5]. В конце эксперимента у «адаптированных» культур стафилококков определяли чувствительность (ИндБ, %) к бактерицидному действию «интерцида» по вышеописанной методике.

Результаты обработаны методами вариационной статистики [8].

### Результаты исследований

На 7 штаммах стафилококков разных видов, в том числе *S. aureus* (n=2), *S. caritis* (n=2), *S. haemolyticus* (n=2) и *S. warneri* (n=1), изучена выраженность бактерицидного действия (ИндБ, %) «интерцида» в отношении стафилококков в зависимости от его концентрации (рис. 1). Полученные результаты свидетельствовали об увеличении значений ИндБ при повышении концентрации «интерцида» с 1 до 5 мг/мл (дозозависимый эффект). Эту закономерность адекватно (достоверность аппроксимации  $R = 0,996$ ) описывало следующее уравнение регрессии:  $\text{ИндБ} = -0,82 k^3 + 7,51 k^2 - 4,55 k$ , где  $k$  – концентрация «интерцида» (в мг/мл). Отмечено, что в диапазоне концентраций «интерцида» от 0 до 3 мг/мл динамика ИндБ носила характер, близкий к линейному (общий прирост составил 50%), тогда как увеличение концентрации КБЛ до 5 мг/мл обеспечивало менее существенный прирост ИндБ – все-

го на 16% («эффект насыщения»). Эти данные послужили основанием для использования концентрации 5 мг/мл в опытах по определению чувствительности к «интерциду» стафилококков, а концентрации 2 мг/мл – в опытах по адаптации стафилококков к бактерицидному действию катионного белка.

В следующей серии экспериментов *in vitro* проведено исследование бактерицидного действия «интерцида» (концентрация 5 мг/мл) на стафилококки разных видов, результаты которого указывали на выраженное внутриродовое и межштаммовое разнообразие стафилококков по уровню их чувствительности к «интерциду», оцениваемому индексом бактерицидности – ИндБ (табл.). В целом стафилококки характеризовались широкой амплитудой варьирования ИндБ (13,0-87,5%), однако их распределение по данному признаку отличалось от нормального и носило бимодальный характер, поскольку у штаммов *S. aureus* ИндБ колебался в диапазоне от 13,0 до 60,0%, а среди КОС – в пределах 52,3-87,5%. Кроме того, более выраженную чувствительность к «интерциду» КОС в сравнении с золотистыми стафилококками отражали и другие параметры, в частности: средние значения ИндБ ( $71,4 \pm 1,8$  против  $36,1 \pm 2,8\%$ ,  $p < 0,05$ ), а также величина доли штаммов, у которых ИндБ превышал 60% ( $91,7 \pm 5,8$  против  $3,7 \pm 3,7\%$ ,  $p < 0,05$ ). Среди изученных видов КОС минимальной чувствительностью к бактерицидному действию «интерцида» обладали представители видов *S. haemolyticus*, *S. caritis* и *S. simulans* (средние значения ИндБ – 62,4-66,3%),

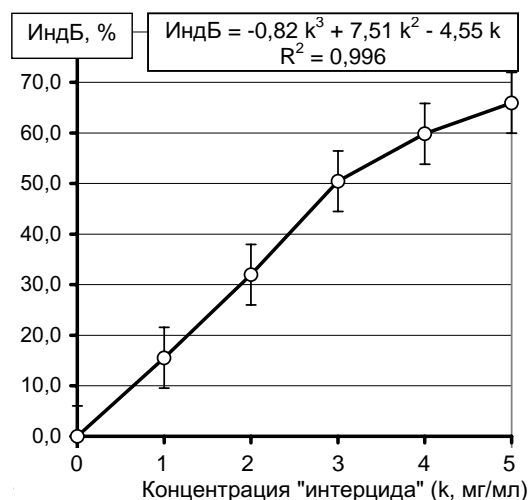


Рисунок 1. Влияние концентрации «интерцида» на уровень его бактерицидного эффекта в отношении стафилококков.

Обозначения: по оси абсцисс – концентрация «интерцида» (мг/мл); по оси ординат – ИндБ (%)

максимальной – *S. hominis* и *S. warneri* (74,7 и 75,1), а *S. epidermidis* занимали промежуточное положение, но отличались наибольшим разнообразием, совпадающим по амплитуде вариабельности ИндБ (52,3-87,5%) с диапазоном гетерогенности всей группы КОС.

Учитывая этиологическую причастность *S. aureus* и КОС (в частности, *S. epidermidis*) к развитию гнойно-воспалительных заболеваний различной локализации (абсцессы, флегмоны и др.) и возможность их контакта в очагах воспаления с катионными белками фагоцитов, представлялось важным оценить адаптивный потенциал стафилококков к «интерциду». Из результатов опытов с последовательными пересевами штаммов *S. aureus* P209 и *S. epidermidis* ОЛ6 (исходно обладающих высокой чувствительностью к «интерциду» – ИндБ 42,2 и 80,0%) в МПБ с этим катионным белком (концентрация 2 мг/мл) видно, что стафилококки способны относительно быстро (через 1-2 пассажа) адаптироваться к «интерциду», восстанавливая характер динамики накопления биомассы (рис. 2А), постепенно повышая удельную скорость роста –  $\mu$  (рис. 2Б) и увеличивая уровень своей «интерцид»-резистентности – ИндР (рис. 2В). Так, при третьем пересеве в МПБ с «интерцидом» у адаптированных стафилококков величины  $\mu$  на 2-24 ч. не отличались от контроля, а уровень ИндР составил 103,2-112,9%, что указывало на абсолютную устойчивость микроорганизмов к данному бактерицидному агенту.

Таблица. Характеристика стафилококков по их чувствительности к бактерицидному действию «интерцида»

Вид стафилококков	Кол-во штаммов (n)	Параметры чувствительности к «интерциду»		
		диапазон ИндБ (min-max)	доля штаммов с ИндБ $\geq 60\%$ (%)	ИндБ, % (M $\pm$ m)
<i>S. aureus</i>	27	13,0-60,0	3,7 $\pm$ 3,7	36,1 $\pm$ 2,8
КОС, в том числе:	24	52,3-87,5	91,7 $\pm$ 5,8*	71,4 $\pm$ 1,8*
<i>S. epidermidis</i>	9	52,3-87,5	88,9 $\pm$ 11,1*	73,4 $\pm$ 4,1*
<i>S. warneri</i>	5	71,7-76,9	100	75,1 $\pm$ 1,1*
<i>S. haemolyticus</i>	4	56,8-71,4	75,0 $\pm$ 25,0*	66,3 $\pm$ 3,3*
<i>S. hominis</i>	3	69,8-80,0	100	74,7 $\pm$ 2,9*
<i>S. capitis</i>	2	62,2-62,5	100	62,4 $\pm$ 0,1*
<i>S. simulans</i>	1	-	100	63,9
Итого	51	13,0-87,5	45,1 $\pm$ 7,0	52,7 $\pm$ 3,0

Примечание: \* – достоверные отличия в сравнении с *S. aureus* ( $p < 0,05$ ); КОС – коагулазоотрицательные стафилококки; ИндБ – индекс бактерицидности.

Этот вывод подтверждали результаты «прямого» тестирования чувствительности адаптированных культур стафилококков к «интерциду», поскольку у них ИндБ понизился с 56,6% до 16,9%. Отрицательные значения ИндБ свидетельствовали о «стимулирующем» эффекте (около 17%) обработки бактерий данным катионным белком, ранее описанном в отношении *E. coli* [4]. Причем высокая «интерцид»-резистентность у адаптированных микроорганизмов сохранялась даже после однократного их пассажа в МПБ без «интерцида». Иначе говоря, для дезадаптации стафилококков и снижения у них устойчивости к «интерциду» (до зафиксированного «музейного» – видового или штаммового уровней), очевидно, требуются более многочисленные пересевы бактерий на средах, лишенных данного бактерицидного агента.

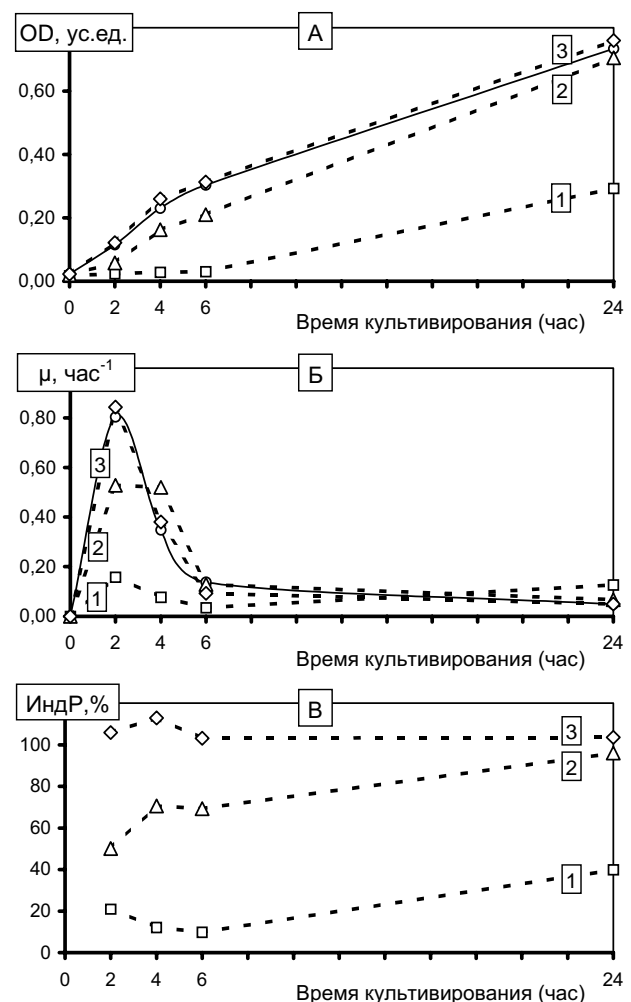


Рисунок 2. Динамика биомассы (А), удельной скорости роста –  $\mu$  (Б) и индекса резистентности – ИндР (В) стафилококков при адаптации к «интерциду»  
Обозначения: по оси абсцисс – время (час); по осям ординат – OD (ус.ед.),  $\mu$  (час<sup>-1</sup>), ИндР (%); сплошная линия – контроль; пунктирные линии с цифрами – 1-3 пересевы стафилококков в МПБ с «интерцидом» (2 мг/мл)

### Обсуждение результатов

Представленные экспериментальные данные о влиянии *in vitro* катионного белка лейкоцитов «интерцида» на стафилококки разных видов интересны в нескольких аспектах.

Прежде всего они отражают гетерогенность рода *Staphylococcus* по чувствительности его представителей к бактерицидному действию «интерцида», которая проявляется как на межвидовом, так и внутривидовом уровнях. Необходимо отметить, что золотистые стафилококки почти в два раза менее к нему чувствительны, чем коагулазоотрицательные стафилококки, хотя в обеих группах микроорганизмов регистрируются широкие диапазоны межштаммовой вариабельности данного признака. С общепатологических позиций, это указывает на выраженное меж- и внутривидовое фенотипическое разнообразие указанных микроорганизмов, а в медицинском плане, учитывая важную роль катионных пептидов *in vivo* в обеспечении кислороднезависимого киллинга бактерий [1], – объясняет преимущественное участие *S. aureus* в развитии гнойно-воспалительных заболеваний стафилококковой этиологии.

В то же время обнаруженная у стафилококков способность адаптироваться и повышать свою резистентность к бактерицидному действию «интерцида» свидетельствует не только об относительной эффективности катионных белков лейкоцитов в антибактериальной защите макроорганизма от стафилококковой агрессии, но и о возможных механизмах, которые позволяют КОС вызывать инфекционно-воспалительные процессы разной локализации. Так как непосредственные причины повышения «интерцид»-резистентности стафилококков пока остаются загадкой, выскажем на этот счет несколько предположений. Адаптация стафилококков к «интерциду» может сопровождаться: а) селекцией и накоплением в бактериальной популяции клонов, имманентно устойчивых к его летальному действию; б) структурно-

функциональной трансформацией стафилококков, которая индуцируется напрямую «интерцидом» («экзогенный сигнал») и/или опосредованно продуктами гибели «интерцид»-чувствительных бактерий («эндогенный сигнал»), возможно, с вовлечением в этот процесс «глобальной регуляторной системы» – agr, функционирующей как у *S. aureus*, так и КОС [6], что в конечном итоге приводит к повышению резистентности стафилококков к «интерциду».

Остается пока открытым и вопрос о вкладе «антиинтерцидной» активности в обеспечение устойчивости стафилококков к данному катионному белку, хотя известно, что подобная активность у золотистых стафилококков выявляется значительно чаще, чем у КОС (78,2% штаммов *S. aureus*, против 32,9% изолятов *S. epidermidis*) [6].

Нельзя исключить, что «интерцид»-резистентность стафилококков («базисная» для *S. aureus* или «адаптивная» для КОС) сообщает им дополнительные патогенные свойства, обеспечивая на этапе альтерации при встрече с эффекторами иммунитета хозяина выживание бактерий в очаге воспаления и способствуя их дальнейшей персистенции в тканях макроорганизма. В этом смысле низкий уровень чувствительности стафилококков (особенно КОС), по всей видимости, может служить маркером их адаптированности к существованию во внутренней среде макроорганизма.

Вместе с тем, сравнивая в целом *Escherichia coli* и стафилококки по уровню их устойчивости к «интерциду», следует отметить более высокий уровень резистентности эшерихий к бактерицидному эффекту данного катионного белка [4, 5], что, по-видимому, обусловлено особенностями архитектоники и физико-химических свойств клеточной стенки грамотрицательных и грампозитивных бактерий, которые оказывают существенное влияние на характер их взаимодействия с «интерцидом» и, вероятно, другими катионными пептидами макроорганизма.

### Список использованной литературы:

1. Маянский А.Н., Маянский Д.Н. Очерки о нейтрофиле и макрофаге. Новосибирск: Наука, 1989.
2. Ждан-Пушкина С.М., Рыбакова Л.П. О реакциях *Escherichia coli* на действие катионных белков лейкоцитов крови // Журн. микробиол. 1991; 7: 5-8.
3. Бухарин О.В., Усвяцов Б.Я. Бактерионосительство (медико-экологический аспект). – Екатеринбург: УрО РАН, 1996.
4. Бухарин О.В., Гриценко В.А. Влияние *in vitro* препарата лейкоцитарного катионного белка «интерцида» на *Escherichia coli* // Антибиот. и химиотерапия, 2000; Т. 45 (№1): 16-20.
5. Гриценко В.А., Шухман М.Г. Устойчивость *Escherichia coli* к лейкоцитарному катионному белку «интерциду» // Журн. микробиол. 2000; 4 (Приложение): 71-76.
6. Дерябин Д.Г. Стафилококки: экология и патогенность. – Екатеринбург: УрО РАН, 2000.
7. Перт С.Дж. Основы культивирования микроорганизмов и клеток. – М., 1978.
8. Лакин Г.Ф. Биометрия. М.: Высшая школа, 1990.