

## БАКТЕРИЦИДНЫЕ ЭФФЕКТЫ АКТИВНЫХ МЕТАБОЛИТОВ КИСЛОРОДА

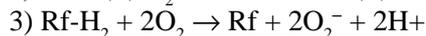
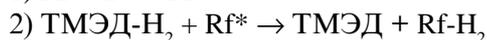
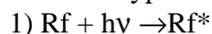
Изучение механизмов устойчивости микроорганизмов к фагоцитарному киллингу сталкивается, с одной стороны, с проблемами многообразия таких механизмов, с другой – с необходимостью моделирования фагоцитарных реакций *in vitro*. В обоих случаях при исследовании ключевого бактерицидного фактора фагоцитов – кислородзависимых механизмов киллинга – и механизмов антиоксидантной защиты микроорганизмов актуальной задачей становится разработка методических подходов к созданию модельных систем генерации активных метаболитов кислорода, идентичных образующимся при фагоцитозе. Использование таких систем позволит существенно повысить воспроизводимость получаемых результатов, а также подвергнуть исследованию вклад в выживание при фагоцитозе не только ферментных антиоксидантных систем микроорганизмов, но и неферментных механизмов защиты от кислородных радикалов (низкомолекулярных антиоксидантов, ловушек кислородных радикалов, толерантности и слабой проницаемости наружного слоя бактериальной клетки) [3, 5, 8, 9].

В этой связи нами предпринята попытка тестирования устойчивости бактериальных микроорганизмов (*Escherichia coli* и *Staphylococcus aureus*) к синтезированным *in vitro* супероксиданиону, оксиду азота и пероксинитриту, являющимися ключевыми бактерицидными метаболитами кислорода.

### Материалы и методы исследования

Для синтеза супероксиданиона использован известный принцип, основанный на спонтанном реокислении фотовосстановленного флавина [1, 6, 7]. Условия протекания данной реакции и требования к компонентам, по нашему мнению, наиболее пригодны для использования в качестве среды для оценки жизнеспособности бактериальных

клеток. Конкретная реализация системы генерации супероксиданиона заключалась в использовании 0,05 мМ раствора рибофлавина (Riboflavin, МВ 376,38, «Reanal», Венгрия) и 1мМ раствора тетраметилэтилендиамина («Reanal», Венгрия) в качестве основных реагентов, стабилизированных в 0,2 М фосфатном буфере при pH=7,8 и облучаемых лампой дневного света в присутствии кислорода атмосферного воздуха. Фотохимическая индукция  $O_2^-$ , воспроизводимая в данном варианте синтеза супероксиданиона, описывается уравнениями реакции:



В качестве системы генерации окиси азота обычно используется один из многочисленных доноров в виде водного раствора. Нами в качестве такого донора использован относительно недорогой и доступный реагент – нитропруссид натрия (Sodium nitroprusside, МВ 297,96, «РОСН», Польша).

Для синтеза пероксинитрита (HOONO), образуемого в ходе неферментативного взаимодействия супероксиданион-радикала и окиси азота, достаточно объединить обе вышеназванные системы генерации кислородных метаболитов [2, 4], тем более, что подобранные нами системы генерации супероксиданиона и окиси азота характеризовались сопоставимыми физико-химическими параметрами.

Подбор концентраций компонентов систем генерации АФК производился исходя из следующих принципов: 1) концентрации компонентов систем генерации АФК должны обеспечивать сопоставимость с концентрациями, образующимися при фагоцитозе [10]; 2) подбор концентраций компонентов осуществлялся согласно уравнениям химических реакций, с учетом растворимости реагирующих веществ, требуемой конечной pH среды и ионной силы получаемых растворов;

3) буферный раствор систем генерации АФК был выбран из соображений поддержания оптимальных условий протекания соответствующих реакций при отсутствии существенного влияния на жизнеспособность бактерий; 4) подбор оптимальной экспозиции был направлен на достижение максимального бактерицидного эффекта систем при приемлемом уровне погрешности измерения.

Таким образом, предложенные системы генерации активных форм кислорода состояли из следующих биохимических систем: 1) супероксиданион (рибофлавин + ТМЭД + свет); 2) оксид азота (нитропруссид натрия в качестве донора); 3) пероксинитрит (рибофлавин + ТМЭД + свет + нитропруссид натрия). В контроле указанные компоненты генерации АФК отсутствовали.

Для определения чувствительности бактерий к АФК использовались стеклянные флакончики объемом 10 мл. В 1 пробу (система генерации пероксинитрита) последовательно вносили 0,65 мл 0,2 М калий-фосфатного буфера (рН 7,8), 50 мкл 0,08М тетраметилэтилендиамина, 0,1 мл 5мМ раствора нитропруссида натрия. В последнюю очередь добавлялись 1 мл 0,1 мМ раствора рибофлавина и 0,2 мл бактериальной взвеси ( $10^{6-8}$  бактериальных клеток на мл). Во 2 пробу (система генерации супероксиданиона) вносили 0,65 мл калий-фосфатного буфера, 50 мкл ТМЭДа, 0,1 мл дистиллированной воды, 1 мл раствора рибофлавина и 0,2 мл взвеси бактерий. В 3 пробе (генерация оксида азота) к 0,65 мл калий-фосфатного буфера последовательно прибавляли 0,1 мл раствора нитропруссида натрия, 1,05 мл дистиллированной воды и 0,2 мл бактериальной взвеси. Контроль содержал фосфатный буфер, ТМЭД, 1,1 мл дистиллированной воды и 0,2 мл бактериальной взвеси.

После внесения всех компонентов, пробы облучали лампой дневного света мощностью 20 Вт на расстоянии 10 см от флакончиков в течение 30 мин при комнатной температуре (20°C). Реакцию останавливали прекращением освещения. Из всех проб и контроля отбирали по 0,1 мл и осуществляли посев в 3,0 мл питательного бульона (НПО «Питательные Среды», Махачкала). Жидкую пи-

тательную среду термостатировали при 37°C в течение 4 часов (в случае с *E. coli*) или 6 часов (для *S. aureus*) при постоянном перемешивании. После инкубации осуществляли замер оптической плотности бульонных культур при 540 нм на спектрофотометре СФ-46 (ЛОМО, Россия) относительно стерильного питательного бульона. Результаты пересчитывали в проценты по отношению к оптической плотности выросших в контроле микроорганизмов и выражали в процентах выживших (устойчивость) или погибших (бактерицидность) бактериальных клеток.

В качестве тест-штаммов микроорганизмов были использованы 28 музейных культур *Escherichia coli* и 26 музейных культур *Staphylococcus aureus*. Культуры обладали типичными для своих видов биохимическими, культуральными и морфологическими свойствами.

#### Результаты исследования

Инкубация бактерий в присутствии изучаемых активных метаболитов кислорода сопровождалась выраженным бактерицидным эффектом последних. При этом наименьшую бактерицидность в отношении *S. aureus* проявлял оксид азота. Чувствительны к NO были 91,3% штаммов данной выборки, т.е. два из двадцати трех бактериальных изолятов оказались не чувствительны к действию данного продукта. Выживание стафилококков после контакта с окисью азота варьировало в пределах от 37% до 98%. Среднее значение показателя устойчивости данных микроорганизмов составило  $71,7 \pm 17,8\%$  (таблица 1). Супероксиданион-радикал оказывался токсичным для всей выборки стафилококков. Устойчивость к  $O_2^-$  варьировала от 21 до 98%, тогда как среднее значение составило  $58,5 \pm 21,5\%$ . Наиболее токсичным продуктом для золотистых стафилококков оказался пероксинитрит. Бактерии данной выборки оказывались чувствительными к данному агенту в 100% случаев. При контакте с HOONO выживало в среднем  $50,3 \pm 20,4\%$  бактерий. Выживание *S. aureus* варьировало в пределах от 13% до 92%.

Для кишечной палочки пероксинитрит оказался наименее опасным агентом; устой-

Таблица 1. Устойчивость золотистых стафилококков и кишечных палочек к действию супероксид аниона, оксиду азота (II) и пероксинитриту

	Средние значения устойчивости бактерий к кислородным радикалам (M±m), %	
	S. aureus	E. coli
$\{O_2^{\cdot-}\}$	58,5±21,5*	42,27±14,89*
$\{NO^{\cdot}\}$	71,7±17,8*	43,46±17,32*
$\{HOONO\}$	50,3±20,4	68,1±27,74

Обозначения: \* – P<0,05 (относительно устойчивости бактерий к пероксинитриту).

Таблица 2. Вариабельность показателя бактерицидности систем генерации активных метаболитов кислорода

АФК	Бактерии	Время	Log(KOE)=6	Log(KOE)=7	Log(KOE)=8
$O_2^{\cdot-}$	S.aureus	15 мин	8,8%	13,8%	35,5%
		30 мин	9,3%	12,0%	22,4%
	E.coli	15 мин	9,3%	16,0%	41,9%
		30 мин	5,8%	13,1%	17,3%
NO $^{\cdot}$	S.aureus	15 мин	18,1%	24,6%	70,1%
		30 мин	12,9%	17,5%	32,0%
	E.coli	15 мин	9,3%	24,3%	50,9%
		30 мин	13,2%	14,7%	31,4%
HOONO	S.aureus	15 мин	11,6%	21,8%	42,8%
		30 мин	5,9%	8,9%	15,9%
	E.coli	15 мин	12,8%	17,5%	70,0%
		30 мин	10,1%	10,2%	44,4%

Обозначения: в полях таблицы приведен коэффициент вариабельности индекса бактерицидности в системах генерации АФК.  $O_2^{\cdot-}$  – супероксиданион; NO $^{\cdot}$  – оксид азота (II); HOONO – пероксинитрит. Log(KOE) – конечная концентрация бактерий в системе.

чивыми к нему оказались 68,1±27,74%. Не чувствительными к HOONO были 17,4% штаммов, диапазон варьирования устойчивости эшерихий: от 14% до 90%. Токсический эффект NO $^{\cdot}$  и  $O_2^{\cdot-}$  был примерно одинаков, среднее значение устойчивости E. coli к оксиду азота составило 43,46±17,32%, а к супероксид аниону – 42,27±14,89%. Чувствительными к данным продуктам оказалось 100% штаммов данной выборки. Устойчивость к NO $^{\cdot}$  варьировала в пределах от 17% до 78%, к  $O_2^{\cdot-}$  от 7% до 73%.

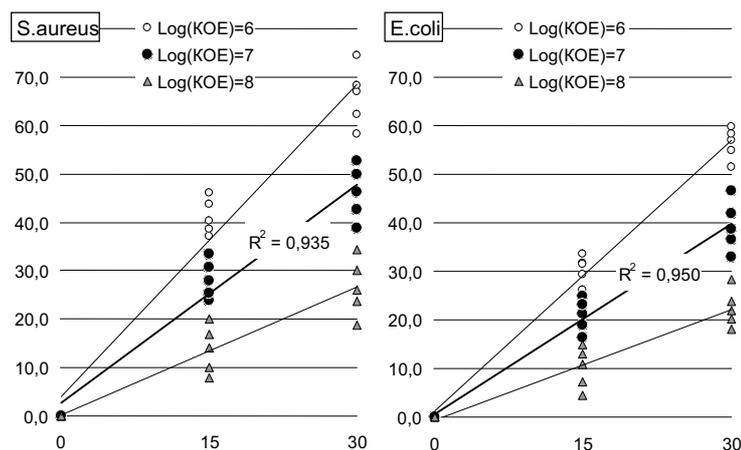
Из графиков зависимостей бактерицидности систем от времени инкубации и концентрации бактерий (рисунки 1–3) видно, что оптимальной является 30-минутная инкубация (сохранение линейной динамики киллинга и достаточный бактерицидный эффект). При этом пригодными для использования являются все три испытанные концентрации бактерий (Log(KOE) от 6 до 8 на 1 мл реакционной среды). Однако меньшая концентрация (Log(KOE)=6 мл<sup>-1</sup>) обеспечивала относитель-

но слабую бактерицидность оксида азота и пероксинитрита в отношении E.coli. Более высокие концентрации бактерий вызывали более выраженную бактерицидность систем, что свидетельствует об определенном запасе по бактерицидному потенциалу. Однако при концентрации 10<sup>8</sup> мл<sup>-1</sup> наблюдалось выраженное увеличение погрешности определения (таблица 2), связанное, очевидно, с неизбежной для применяемой лабораторной техники титрования погрешностью дозирования бактерий.

Иными словами, оптимальными условиями проведения теста на выживание бактерий в среде с АФК были концентрация бактерий, равная 10<sup>7</sup> мл<sup>-1</sup>, при 30-минутной инкубации бактериальной взвеси в среде реагирования.

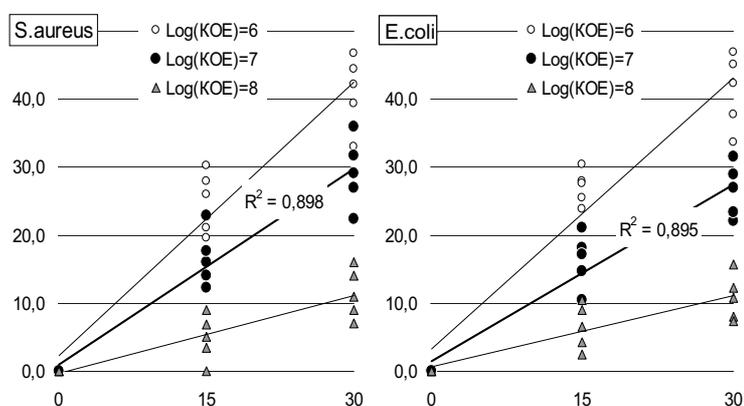
Таким образом, результаты исследования параметров выживания бактерий при инкубации в среде с синтезируемыми метаболитами кислорода позволили выявить следующие закономерности.

Во-первых, показан выраженный бактерицидный эффект предложенных систем ге-



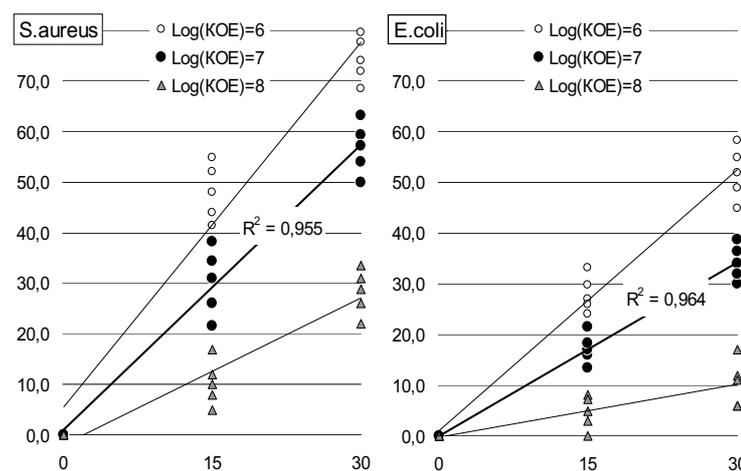
Обозначения: по оси абсцисс – время контакта, минуты; по оси ординат – индекс бактерицидности, %.  
Log(KOE) – конечная концентрация бактерий в системе.

Рисунок 1. Бактерицидность супероксиданион радикала ( $O_2^-$ )



Обозначения: по оси абсцисс – время контакта, минуты; по оси ординат – индекс бактерицидности, %.  
Log(KOE) – конечная концентрация бактерий в системе

Рисунок 2. Бактерицидность оксида азота (NO)



Обозначения: по оси абсцисс – время контакта, минуты; по оси ординат – индекс бактерицидности, %.  
Log(KOE) – конечная концентрация бактерий в системе

Рисунок 3. Бактерицидность пероксинитрита ( $HOONO$ )

нерации супероксиданиона, оксида азота и пероксинитрита, что делает эти системы пригодными для воспроизведения окислительных фагоцитарных реакций *in vitro*. При этом синтез супероксиданиона производился в системе, содержащей рибофлавин и тетраметилэтилендиамин, при дозированном количестве света. В качестве источника оксида азота использовали стандартный донатор NO – нитропруссид натрия. Для синтеза пероксинитрита применяли смесь из вышеперечисленных систем генераций активных кислородных радикалов.

Во-вторых, наблюдаются существенные межвидовые и штаммовые отличия в профи-

лях устойчивости кишечных палочек и золотистых стафилококков к указанным метаболитам кислорода, что открывает перспективу дальнейшего изучения биологической роли антиоксидантных свойств бактерий. При этом использованные методические подходы пригодны для определения спектра (профиля) устойчивости бактерий к метаболитам кислорода, построены на стандартных приемах синтеза радикалов и ориентированы на исследование резистентности микроорганизмов параллельно к трем метаболитам, обеспечивающим наибольший вклад в бактерицидность респираторного взрыва при фагоцитозе.

#### Список использованной литературы:

1. Beauchamp C., Fridovich I. Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels// *Anal. Biochem.*- 1971.- V.44.- P.276-287.
2. Beckman, J. S., Koppenol, W. H. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly//*Am J Physiol.*- 1996.- v.271.- P.C1424-C1437.
3. Bryk R., Griffin P., Nathan C. Peroxynitrite reductase activity of bacterial peroxiredoxins// *Nature.*- 2000.- V.407(6801).- P.211-215.
4. Cheung, P. Y., Danial, H., Jong, J., and Schulz, R. Thiols protect the inhibition of myocardial aconitase by peroxynitrite// *Arch Biochem Biophys.*- 1998.- v.350.- P.104-108.
5. Ehrt S., Shiloh M.U., Ruan J., Choi M., Gunzburg S., Nathan C., Xie Q., Riley L.W. A novel antioxidant gene from *Mycobacterium tuberculosis*// *J. Exp. Med.*- 1997.- V.186(11).- P.1885.
6. Grunow M., Schopp W. Determination of the activity of superoxide dismutase in terms of re substrate conversion// *Biomed. Biochim. Acta.*- 1989.- V.40.- P.185-199.
7. Haseloff R.F., Gruner S., Wischnewsky G.G. Reactions of copper complexes with oxygen radicals generated by human neutrophils// *J. Biolumin. Chemilumin.*- 1992.- V.7(3).- P.171-175.
8. Horsburgh M.J., Ingham E., Foster S.J. In *Staphylococcus aureus*, fur is an interactive regulator with PerR, contributes to virulence, and is necessary for oxidative stress resistance through positive regulation of catalase and iron homeostasis// *J. Bacteriol.*- 2001.- V.183(2).- P.468-475.
9. Lundberg B.E., Wolf R.E.Jr., Dinauer M.C., Xu Y., Fang F.C., Glucose 6-phosphate dehydrogenase is required for *Salmonella typhimurium* virulence and resistance to reactive oxygen and nitrogen intermediates// *Infect. Immun.*- 1999.- V.67(1).- P.436-438.
10. Zhu L., Gunn C., Beckman J.S. Bactericidal activity of peroxynitrite// *Arch. Biochem. and Biophys.*- 1992.- V. 298(2).- P. 452-457.