

## УСТОЙЧИВОСТЬ МИКРООРГАНИЗМОВ К СУПЕРОКСИДАНИОНУ, ОКСИДУ АЗОТА И ПЕРОКСИНИТРИТУ КАК ФАКТОР ИХ ВЫЖИВАНИЯ ПРИ ФАГОЦИТОЗЕ

При использовании 23 культур *Escherichia coli* и 23 культур *Staphylococcus aureus*, обладающих различным уровнем устойчивости к активным формам кислорода (АФК; супероксиданиону, оксиду азота и пероксинитриту), определены параметры варибельности бактерицидности нейтрофилов крови человека в стандартных условиях фагоцитоза *in vitro*. На этой основе проведен сравнительный анализ вклада ферментов-антиоксидантов бактерий и их устойчивости к АФК в выживании при фагоцитозе.

**Ключевые слова:** фагоцитоз, активные метаболиты кислорода, бактерицидность, супероксиддисмутаза, каталаза, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*.

Вопрос о роли тех или иных механизмов защиты микроорганизмов от кислородзависимых бактерицидных механизмов по-прежнему остается открытым. Общепризнанной считается важная роль ферментов-антиоксидантов в выживании бактерий при фагоцитозе. Однако из доступной нам литературы известно и о возможной роли иных, неферментативных, механизмов защиты от кислородных радикалов (низкомолекулярные антиоксиданты, ловушки кислородных радикалов, толерантность и слабая проницаемость наружного слоя бактериальной клетки) [2, 3, 4, 5]. В данной работе предпринята попытка первичной оценки вклада устойчивости к метаболитам кислорода *in vitro* характеристик бактерий в их выживание при фагоцитозе.

### Материалы и методы исследования

Ранее [1] нами предложен подход к оценке устойчивости бактерий к спектру активных форм кислорода (АФК), идентичных образующимся в ходе респираторного взрыва при фагоцитозе. Для генерации активных форм кислорода нами использована система, состоящая из 0,05 мМ раствора рибофлавина (Riboflavin, MB 376.38, «Reanal», Венгрия) и 1 мМ раствора тетраметилэтилендиамина («Reanal», Венгрия) в 0,2 М фосфатном буфере pH 7,8, облучаемых лампой дневного света. В качестве источника окиси азота нами использован нитропруссид натрия (Sodium nitroprusside, MB 297.96, «РОСН», Польша). Схематично приготовление систем генерации АФК [1] представлено в таблице 1.

После внесения всех компонентов пробы облучали лампой дневного света мощностью

20 Вт на расстоянии 10 см в течение 30 мин. при комнатной температуре (20 °С). 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 питательную среду термостатировали при 37 °С в течение 4 часов (в случае определения устойчивости к супероксиданиону, NO-радикалу и азотсодержащим вторичным кислородным радикалам *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 переводили в проценты по отношению к оптической плотности выросших в контроле микроорганизмов.

Таблица 1. Компоненты для создания систем генерации кислородных радикалов и тестирования устойчивости бактерий к АФК

Компоненты системы	1 проба	2 проба	3 проба	Контроль	Концентрация
Рибофлавин, мкл	1000	1000	0	0	0,05мМ
ТМЭД, мкл	50	50	0	50	1мМ
Нитропруссид натрия, мкл	100	0	100	0	0,25мМ
Бактериальная взвесь, мкл	200	200	200	200	10 <sup>7</sup>
Буфер, мкл	650	650	650	650	
Вода (дист.), мкл	0	100	1050	1100	
pH*	8,13	8,10	7,85	8,12	

Обозначения: \* – эмпирический результат.

Определение устойчивости бактерий к кислород- и азотсодержащим продуктам реакций респираторного взрыва производилось на 23 штаммах золотистого стафилококка и 23 штаммах кишечной палочки, использованных нами ранее [1] и характеризовавшихся различной выраженностью продукции ферментов антиоксидантов (супероксиддисмутаза и каталаза) и устойчивостью к АФК.

### Результаты исследования

Наименьший бактерицидный эффект на представителей вида *S. aureus* оказывал оксид азота. Чувствительны к  $\text{NO}$  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 2).

Супероксиданион-радикал оказывался токсичным для всей выборки стафилококков. Устойчивость к  $\text{O}_2^{\cdot-}$  варьировала от 21 до 98%, тогда как среднее значение составило  $58,5 \pm 21,5\%$ . Наиболее токсичным продуктом для золотистых стафилококков явился пероксинитрит. Бактерии данной выборки оказывались чувствительными к данному агенту в 100% случаев. При контакте с  $\text{HOONO}$  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; устойчивыми к нему оказались  $68,1 \pm 27,74\%$ . Не чувствительными к  $\text{HOONO}$  были 17,4% штаммов, диапазон варьирования устойчивости эшерихий: от 14% до 90%. Токсический эффект  $\text{NO}$  и  $\text{O}_2^{\cdot-}$  был примерно одинаков, среднее значение устойчивости *E. coli* к оксиду азота составило  $43,46 \pm 17,32\%$ , а к супероксид аниону –  $42,27 \pm 14,89\%$ . Чувствительными к данным продуктам оказалось 100% штаммов данной выборки. Устойчивость к  $\text{NO}$  варьировала в пределах от 17% до 78%, к  $\text{O}_2^{\cdot-}$  от 7% до 73%.

Для оценки роли устойчивости к супероксиданион-радикалу в выживании бактерий при фагоцитозе, а также в способности микроорганизмов активировать клетки-фагоциты все изучаемые штаммы были разделены на низко- и высокоустойчивые (таблица 3). Среди стафи-

Таблица 2. Устойчивость *S. aureus* и *E. coli* к действию супероксиданиона, оксида азота ( $\text{II}$ ) и пероксинитрита

АФК	Средние значения устойчивости бактерий к кислородным радикалам ( $M \pm m$ ), %	
	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>
$\text{O}_2^{\cdot-}$	$58,5 \pm 21,5^*$	$42,27 \pm 14,89^*$
$\text{NO}$	$71,7 \pm 17,8^*$	$43,46 \pm 17,32^*$
$\text{HOONO}$	$50,3 \pm 20,4$	$68,1 \pm 27,74$

Обозначения: \* –  $P < 0,05$  (относительно устойчивости бактерий к пероксинитриту).  $\text{O}_2^{\cdot-}$  – супероксиданион;  $\text{NO}$  – оксид азота;  $\text{HOONO}$  – пероксинитрит.

лококков слабой устойчивостью к токсическому действию  $\text{O}_2^{\cdot-}$  обладали 43,5% штаммов. При этом наблюдались достоверные различия в выживании опсонизированных бактерий данной группы со стафилококками, мало чувствительными к супероксиданиону. Среднее значение индекса выживания первых составило  $8,35 \pm 1,27\%$ , тогда как у опсонизированных микроорганизмов, проявляющих высокую устойчивость к  $\text{O}_2^{\cdot-}$ , –  $25,75 \pm 7,82\%$  ( $P < 0,05$ ). Внутри групп, как и во всей выборке штаммов, наблюдались статистически значимые различия между нативными и обработанными сывороткой крови микроорганизмами по активации нейтрофилов и выживанию бактерий.

Среди штаммов *E. coli* 82,6% обладали слабой устойчивостью к  $\text{O}_2^{\cdot-}$ . Для подвергшихся опсонизации кишечных палочек сравниваемых групп имели место достоверные различия как по активации фагоцитов, так и по выживанию бактерий. Среднее значение индексов активации высокочувствительных к супероксиданиону эшерихий, обработанных сывороткой крови, составило  $1,79 \pm 0,13$ , а у штаммов, обладающих более высокой устойчивостью к данному окислителю, –  $1,29 \pm 0,16$  ( $P < 0,05$ ). Средние значения индексов выживания бактерий этих групп составили  $43,9 \pm 6,35\%$  и  $77,37 \pm 14,85\%$  соответственно ( $P < 0,05$ ).

При анализе устойчивости бактерий к оксиду азота нами также было осуществлено условное разделение всех микроорганизмов на чувствительные (штаммы, обладающие устойчивостью к окиси азота менее 50%) и устойчивые к действию  $\text{NO}$  (штаммы, обладающие устойчивостью к оксиду азота более 50%). Данные представлены в таблице 4.

Среди штаммов *S. aureus* только четыре были высоко чувствительны к действию  $\text{NO}$ , что состав-

ляет 17,4% от всей выборки. По способности активировать фагоциты значимо отличались нативные и опсонизированные микроорганизмы, устойчивые к оксиду азота. Достоверно различались опсонизированные и неопсонизированные стафилококки обеих групп по способности выживать при фагоцитозе. Наиболее подверженными бактерицидному влиянию фагоцитов оказались опсонизированные бактерии, обладающие высокой чувствительностью к действию окиси азота, индекс выживания данных микроорганизмов составил всего  $6,92 \pm 2,48\%$ , что почти в три раза меньше по сравнению с устойчивыми к  $\text{NO}$  штаммами, у которых среднее значение индекса выживания составило  $20,56 \pm 5,6\%$  ( $P < 0,05$ ). У кишечных палочек двух сравниваемых групп существенные отличия имелись лишь в индексах активации нейтрофилов нативными бактериями. Таким образом, было обнаружено, что устойчивость к токсическому действию  $\text{NO}$  существенно не влияла на способность микроорганизмов активировать клетки-фагоциты и выживать при фагоцитозе.

Среди штаммов стафилококков 56,5% изучаемой выборки обладали высокой чувствительностью к пероксинитриту и прочим продуктам взаимодействия  $\text{NO}$  и  $\text{O}_2^-$ . Средние значения индексов активации нейтрофилов и индексов выживания бактерий, обладающих высокой и низкой устойчивостью к  $\text{HOONO}$ , были достоверно отличны между опсонизированными и неопсонизированными стафилококками. Устойчивые к пероксинитриту микроорганизмы выживали при фагоцитозе почти в два раза эффективнее, чем штаммы, чувствительные к данному окислителю (таблица 5).

Кишечные палочки в целом проявляли большую устойчивость к пероксинитриту, чем стафилококки. Примерно 82,6% штаммов обладали низкой чувствительностью к изучаемому продукту. Нативные бактерии данной группы имели среднее значение индекса выживания, равное  $63,7 \pm 3,73\%$ , а чувствительные к  $\text{HOONO}$  –  $17,0 \pm 5,08\%$

( $P < 0,05$ ). Также существенно различались и индексы выживания опсонизированных бактерий:  $56,66,57\%$  и  $17,04 \pm 4,07\%$  соответственно ( $P < 0,05$ ). Между сравниваемыми группами статистически значимых отличий по способности активировать нейтрофилы обнаружено не было.

Дальнейшее проведение анализа взаимосвязей между устойчивостью бактерий к различным токсическим компонентам респираторно-

Таблица 3. Средние значения индексов активации нейтрофилов и индексов выживания бактерий, обладающих высокой и низкой устойчивостью к супероксиданион-радикалу

	N	ИА 1	ИА 2	ИБ 1	ИБ 2
<b>S. aureus</b>					
$\{\text{O}_2^- \leq 50\%$	10	$1,58 \pm 0,12$	$2,74 \pm 0,32^{**}$	$49,0 \pm 8,35$	$8,35 \pm 1,27^{**}$
$\{\text{O}_2^- > 50\%$	13	$1,74 \pm 0,15$	$2,9 \pm 0,31^{**}$	$72,93 \pm 10,49$	$25,75 \pm 7,82^{*,**}$
<b>E. coli</b>					
$\{\text{O}_2^- \leq 50\%$	19	$1,45 \pm 0,07$	$1,79 \pm 0,13^{**}$	$54,89 \pm 5,9$	$43,9 \pm 6,35$
$\{\text{O}_2^- > 50\%$	4	$1,48 \pm 0,29$	$1,29 \pm 0,16^*$	$58,86 \pm 5,34$	$77,37 \pm 14,85^*$

Обозначения:  $\{\text{O}_2^- \leq 50\%$  – штаммы, обладающие устойчивостью к супероксид аниону, равной 50% и ниже,  $\{\text{O}_2^- > 50\%$  – штаммы, обладающие высокой устойчивостью к супероксид аниону, более 50%, N – количество штаммов, ИВ 1 – индекс выживания неопсонизированных бактерий, ИВ 2 – индекс выживания опсонизированных бактерий, ИА 1 – индекс активации нейтрофилов неопсонизированными бактериями, ИА 2 – индекс активации нейтрофилов опсонизированными бактериями, \* – достоверные различия между значениями индексов относительно бактерий с  $\{\text{O}_2^- > 50\%$  ( $P < 0,05$ ), \*\* – достоверные различия между соответствующими индексами относительно группы неопсонизированных бактерий ( $P < 0,05$ ).

Таблица 4. Средние значения индексов активации нейтрофилов и индексов выживания бактерий, обладающих высокой и низкой устойчивостью к оксиду азота

	N	ИА 1	ИА 2	ИБ 1	ИБ 2
<b>S. aureus</b>					
$\{\text{NO} \cdot \leq 50\%$	4	$1,96 \pm 0,39$	$2,91 \pm 0,62$	$55,0 \pm 23,62$	$6,92 \pm 2,48^{**}$
$\{\text{NO} \cdot > 50\%$	19	$1,61 \pm 0,09$	$2,81 \pm 0,24^{**}$	$64,11 \pm 7,59$	$20,56 \pm 5,6^{*,**}$
<b>E. coli</b>					
$\{\text{NO} \cdot \leq 50\%$	15	$1,58 \pm 0,06$	$1,79 \pm 0,15$	$52,74 \pm 7,32$	$42,6 \pm 7,54$
$\{\text{NO} \cdot > 50\%$	8	$1,24 \pm 0,15^*$	$1,55 \pm 0,2$	$60,9 \pm 3,47$	$63,09 \pm 10,37$

Обозначения: см. к таблице 3.

Таблица 5. Средние значения индексов активации нейтрофилов и индексов выживания бактерий, обладающих высокой и низкой устойчивостью к пероксинитриту

Устойчивость, %	N	ИА 1	ИА 2	ИБ 1	ИБ 2
<b>S. aureus</b>					
$\{\text{HOONO}\} \leq 50$	13	$1,72 \pm 0,1$	$3,04 \pm 0,26^{**}$	$48,44 \pm 8,21$	$10,03 \pm 3,23^{**}$
$\{\text{HOONO}\} > 50$	10	$1,6 \pm 0,19$	$2,56 \pm 0,37^{**}$	$80,8 \pm 10,7^*$	$28,79 \pm 9,3^{**}$
<b>E. coli</b>					
$\{\text{HOONO}\} \leq 50$	4	$1,65 \pm 0,16$	$1,98 \pm 0,26$	$17,0 \pm 5,08$	$17,04 \pm 4,07$
$\{\text{HOONO}\} > 50$	19	$1,42 \pm 0,08$	$1,64 \pm 0,13$	$63,7 \pm 3,73^*$	$56,6 \pm 6,57^*$

Обозначения: см. к таблице 3.

го взрыва и способностью активировать нейтрофилы, а также выживать в ходе фагоцитоза было осуществлено с использованием корреляционного метода статистики (таблица 6).

Таким образом, исследование связи параметров выживания бактерий при контакте с синтезируемыми радикалами с параметрами выживания при фагоцитозе позволили выявить следующие закономерности (таблица 7).

Во-первых, наименьший бактерицидный эффект на представителей вида *S.aureus* оказывал оксид азота; наиболее токсичным продуктом для *S.aureus* явился пероксинитрит. Во-вторых, для *E.coli* пероксинитрит, напротив, оказался наименее опасным агентом, в то время как токсический эффект  $\text{NO}\cdot$  и  $\text{O}_2\cdot^-$  был примерно одинаков. В-третьих, устойчивость к АФК, как выяснилось, связана с активацией нейтрофилов и, в особенности, с выживанием бактерий при фагоцитозе. При этом наиболее выраженная связь с выживанием отмечена для показателя устойчивости стафилококков и кишечных палочек к пероксинитриту. В наименьшей степени с изучаемыми феноменами был связан показатель устойчивости к окиси азота.

Таблица 6. Связь между устойчивостью бактерий к различным АФК и их выживанием при фагоцитозе, активностью ферментов-антиоксидантов и способностью активировать нейтрофилы крови человека

Устойчивость к АФК	Коэффициенты линейной корреляции					
	ИА1	ИА2	ИБ1	ИБ2	СОД	Кат.
<b>S.aureus</b>						
{O <sub>2</sub> <sup>·-</sup> }	0,108	0,009	0,489*	0,552*	0,569*	0,529*
{NO <sup>·</sup> }	-0,414*	-0,155	0,134	0,469*	0,354	0,248
{HOONO}	-0,321	-0,309	0,541*	0,587*	0,725*	0,457*
<b>E.coli</b>						
{O <sub>2</sub> <sup>·-</sup> }	-0,441*	-0,311	0,261	0,518*	0,769*	-0,012
{NO <sup>·</sup> }	-0,330	-0,254	0,208	0,355	0,428*	0,031
{HOONO}	-0,261	-0,291	0,689*	0,573*	0,399	0,345*

Обозначения: Кат. – каталазная/пероксидазная активность, \* – P<0,05.

Таблица 7. Связь устойчивости бактерий к АФК со способностью активировать нейтрофилы крови человека и выживать при фагоцитозе

Устойчивость к радикалам		Активация нейтрофилов		Выживание бактерий	
		по критерию t	по корреляции	по критерию t	по корреляции
{O <sub>2</sub> <sup>·-</sup> }	1	-	↓ EC	-	↑ SA
	2	↓ EC	-	↑ SA, ↑ EC	↑ SA, ↑ EC
{NO <sup>·</sup> }	1	↓ EC	↓ SA	-	-
	2	-	-	↑ SA	↑ SA
{HOONO}	1	-	-	↑ SA	↑ SA, ↑ EC
	2	-	-	↑ EC	↑ SA, ↑ EC

Обозначения: 1 – нативные бактерии; 2 – бактерии, опсонизированные сывороткой крови; - и - – достоверное изменение (повышение или снижение) признака; SA, EC, EF – *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*.

**Список использованной литературы:**

1. Брудастов Ю.А., Бачурская Н.С., Петрова Е.В., Брудастов А.Н. Бактерицидные эффекты активных метаболитов кислорода // Вестник ОГУ. – 2006. – №12. – С. 27–31.
2. 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.
3. 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.
4. Bryk R., Griffin P., Nathan C. Peroxynitrite reductase activity of bacterial peroxiredoxins // Nature.- 2000. - V.407(6801).- P.211-215.
5. 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.