

УДК 576.809.7

ЛЕКАРСТВЕННАЯ РЕГУЛЯЦИЯ АНТИЛИЗОЦИМНОЙ АКТИВНОСТИ СТАФИЛОКОККОВ

Азнабаева Л. М., Киргизова С. Б.

Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза УрО РАН, Оренбург, Россия (460000, Оренбург, ул. Пионерская, 11), e-mail: infosector@mail.ru

Проведен целенаправленный поиск и отбор лекарственных препаратов – ингибиторов выживания микроорганизмов, модифицирующих их биологические свойства, среди которых существенное значение имеет способность микроорганизмов к инактивации лизоцима. Изучено влияние лекарственных препаратов, используемых для лечения бактериальных инфекций на антилизоцимную активность *Staphylococcus aureus*, выделенных от резидентных бактерионосителей. Выявлено модифицирующее действие препаратов индукторов эндогенного интерферона и эфирных масел на экспрессию и пенетрантность антилизоцимного признака бактерий. Проведенные исследования показали возможность расширения используемого в медицинской практике арсенала высокоактивных и малотоксичных лекарственных средств для более эффективной борьбы с бактериальными инфекциями, вызванными высоковирулентными и антибиотикорезистентными штаммами микроорганизмов.

Ключевые слова: факторы персистенции, антилизоцимная активность, *Staphylococcus aureus*, индукторы интерферона, эфирные масла.

DRUGS REGULATION OF ANTILYSOZYMIC ACTIVITY OF STAPHYLOCOCCUS

Aznabaeva L. M., Kirgizova S. B.

Institute of Cellular and Intracellular Symbiosis UrB RAS, Orenburg, Russia (460000, Orenburg, street Pionerskaya, 11), e-mail: infosector@mail.ru

Purposeful search and selection of drug inhibitors of survival of the microorganisms, modifying their biological properties, among which is essential to the ability of microbial inactivation of lysozyme was carried out. Influence of the medicinal preparations used for treatment of bacterial infections on antilysozymic activity of *Staphylococcus aureus*, allocated from resident carriers was studied. Modifying action of preparations of endogen inductorsof interferon and essential oils on expression and penetration of antilysozymic activity of bacteria was revealed. The conducted researches showed possibility of expansion of arsenal of highly active and low-toxic medicines used in medical practice for more effective fight against the bacterial infections caused by high virulent and antibiotikorezistent strains of microorganisms.

Key words: persistence factors, antilysozyme activity, *Staphylococcus aureus*, interferon inductors, essential oils.

Введение

В процессе эволюции происходил постоянный и теснейший контакт организма человека с миром микроорганизмов, что привело к формированию нормальной микрофлоры тела человека, характеризующейся разнообразием входящих в ее состав компонентов. Известно, что персистентный потенциал микроорганизмов, представляющий совокупность биологических свойств бактерий в условиях их адаптации к хозяину, имеет значение в стабильности и пластичности микросимбиоза верхних дыхательных путей [1]. В последние десятилетия отмечается растущий интерес к изучению микробной экологии организма человека при разнообразных патологических состояниях, в основе которых лежит нарушение нормального биоценоза как одного из составляющих элементов общего гомеостаза [10].

Система «паразит – хозяин» – одна из наиболее древних форм симбиотических отношений между организмами. Если инфекционный процесс задерживается на этапе колонизации, возникает новое состояние – бактерионосительство. Слизистые оболочки верхних дыхательных путей являются одной из экологических ниш, в которых происходит не ограниченное во времени сохранение и размножение стафилококков [6].

Для медицины актуальным является носительство патогенного вида стафилококка – *Staphylococcus aureus*. Этот вид микроорганизмов обладает высокой этиологической значимостью в патологии человека и является одной из причин дисбиотических изменений в микробиоценозах тела человека [2].

Известно, что *Staphylococcus aureus* благодаря наличию набора биологических, в частности персистентных свойств, способен колонизировать слизистые оболочки носовой полости, что может способствовать развитию гнойно-воспалительных заболеваний различной локализации и формированию резидентного стафилококкового бактерионосительства [5]. Одним из секреторных факторов персистенции является антилизозимная активность, впервые описанная в 1986 году и к настоящему времени обнаруженная у большинства грампозитивных и грамотрицательных микроорганизмов. Экспериментально доказано, что антилизозимный признак является одним из маркеров персистенции бактерий [3].

Наиболее часто для борьбы с инфекцией, в том числе и с ее персистирующей формой, применяются антибиотики. Однако антибиотики в дозах, наиболее часто рекомендуемых для лечения, часто являются токсичными не только для микроорганизмов, но и для организма человека. Помимо токсического влияния, возможны аллергические, в том числе анафилактические реакции. Использование антибактериальных препаратов приводит к изменениям в аутомикрофлоре организма, способствуя повреждению иммунных барьеров, что отражается в резком увеличении заболеваний, связанных с нарушениями иммунной защиты организма в современных условиях. Постоянное применение антибиотиков приводит к селекции в организме хозяина устойчивых к антибактериальным препаратам форм микроорганизмов, что затрудняет, а иногда делает невозможным повторное использование лекарственных средств для борьбы с внутриклеточными паразитами [3].

Одним из примеров этого служит появление особых госпитальных штаммов стафилококков, формирующихся в условиях интенсивной антибиотикотерапии и характеризующихся множественной устойчивостью к используемым в настоящее время антибиотическим препаратам, а также выраженными эпидемическими потенциями в условиях медицинского стационара.

В связи с этим актуальным является поиск новых, более специфичных и безвредных препаратов для антибактериальной терапии, модифицирующих биологические свойства микроорганизмов, среди которых существенное значение имеет способность микроорганизмов к персистенции. К таким средствам можно отнести препараты с иммуномодулирующим действием, такие как: летучие компоненты эфирных масел, метаболиты микроорганизмов, представителей нормальной флоры человека. Данные вещества характеризуются широким диапазоном биологической активности, малой токсичностью для организма человека и могут применяться как для лечения, так и для профилактики заболеваний микробной этиологии за счет их модифицирующего влияния на персистентный потенциал бактерий, следствием чего является элиминация патогена и восстановление нормальной микрофлоры [3, 7].

Знание закономерностей формирования патocenозов в любом биотопе человека может иметь значение для прогнозирования возникновения и развития заболеваний, а также дает предпосылки для разработки новых способов коррекции дисбиотических нарушений в микробиоценозах, за счет использования препаратов, наиболее эффективных в отношении подавления факторов персистенции условно-патогенных бактерий.

Цель исследования – оценить способность лекарственных препаратов, используемых для лечения бактериальных инфекций, вызываемых *Staphylococcus aureus*, влиять на антилизоцимную активность штаммов, выделенных от резидентных бактерионосителей золотистых стафилококков.

Материалы и методы исследования

Материалом для исследования послужили 35 штаммов *Staphylococcus aureus* (коллекция Института клеточного и внутриклеточного симбиоза УрО РАН), выделенные из переднего отдела носовой полости стафилококковых бактерионосителей резидентного типа. При обследовании на стафилококковое бактерионосительство здоровых лиц из переднего отдела носа проводился забор исследуемого материала стерильным ватным тампоном и помещался в пробирку с 0,5 мл физиологического раствора хлорида натрия. Тампон ополаскивался в растворе и отжимался о стенки пробирки. Пипеткой переносилось 0,1 мл исследуемого смыва на чашку Петри с желточно-солевым агаром и тщательно растиралось шпателем. Учет и пересев на чистую культуру выросших колоний осуществлялся через 48 часов инкубации в термостате.

Выделение и идентификацию *Staphylococcus aureus* проводили общепринятыми методами на основании морфологических, тинкториальных, культуральных свойств, биохимический профиль оценивали с помощью тест-систем «STAPHYtest» фирмы LACHEMA (Чехия). Была изучена резистентность к наиболее часто применяемым в

практическом здравоохранении антибиотикам: оксацилину, ампицилину, левомецитину, эритромицину, гентамицину, фузидину. Для определения резистентности микроорганизмов к антибиотикам использовался диско-диффузионный метод согласно «Методическим указаниям по определению чувствительности микроорганизмов к антибиотикам» (МУК 4.2.1890-04).

В работе были использованы: коммерческие иммуномодулирующие препараты из группы синтетических индукторов эндогенного интерферона – «Полудан», «Циклоферон», «Амиксин», «Неовир»; эфирные масла серии «Крымские масла» производства ОАО «Никитский ботанический сад» (Украина): кипарис, базилик, пихта, эвкалипт, лимон, мандарин, чайное дерево. Антимикробный эффект иммуномодулирующих препаратов и влияние этих препаратов на антилизоцимную активность изучали по методу [8].

Антимикробный эффект препаратов изучали в описанных ранее концентрациях, применяемых для терапии вирусных и бактериальных инфекций, с использованием тест-культуры: *Staphylococcus aureus* ATCC 6538-P (из музея патогенных и условно патогенных культур при Государственном научно-исследовательском институте стандартизации и контроля медицинских биологических препаратов им. Л. А. Тарасевича). В чашки Петри разливали 1,5 % питательный агар (НПО «Питательные среды», Махачкала) с добавлением 0,1 мл взвеси тест-культуры в концентрации 1×10^9 КОЕ/мл. В толще агара делали лунки диаметром от 6 до 8 мм, в которые вносили 0,1 мл испытуемых препаратов. В качестве контроля использовали изотонический раствор хлорида натрия. Затем чашки инкубировали при температуре 37°C в течение 16–18 ч. Оценку влияния препаратов на бактерии проводили путем сравнения опытных и контрольных лунок на наличие зон угнетения роста тест-культуры. При отсутствии антимикробного действия препарата вокруг контрольных и опытных лунок наблюдался рост стафилококка.

Влияние летучих компонентов эфирных масел изучали по оригинальной методике. Для этого на поверхность плотной питательной среды в чашке Петри засеивалось 0,5 мл 10^2 взвеси культуры микроорганизмов, на внутреннюю сторону крышки наносилось 2,5 мкл эфирного масла, через 20 минут воздействия летучих компонентов, входящих в состав масла, крышки чашек Петри заменяли стерильными. Посевы инкубировались в термостате 24 час при 37°C , влияние на ростовые показатели оценивалось по соотношению количества выросших колоний в опытных и контрольных чашках, 10 % выросших на чашках колоний отсеивалось на скошенный агар, для дальнейшего изучения биологических свойств.

Антилизоцимную активность изучали фотометрическим методом. Исследуемую культуру стафилококка 24 часа выращивали в жидкой питательной среде, отделяли супернатант, инкубировали его с лизоцимом, добавляли полученную смесь к суспензии тест-

культуры *Micrococcuslysodeikticus*, предварительно обработанной трилоном Б, затем измеряли оптическую плотность полученной смеси. Об уровне антилизоцимной активности судили по степени лизиса суспензии тест-культуры микрококка [4].

Для оценки влияния лекарственных веществ на антилизоцимную активность бактерий проводили соинкубирование взвеси *Staphylococcus aureus* с препаратами в условиях шейкер-инкубатора при 37 °С – 60 минут. Затем смесь центрифугировали при 3000 оборотов в минуту, после чего двукратно отмывали клетки физиологическим раствором и засеивали на 1,5 % мясо-пептонный агар. Чашки инкубировали при температуре 37 °С в течение 16–18 ч. с последующим определением у изолятов персистентных свойств. В качестве контроля вместо препаратов использовали изотонический раствор хлорида натрия.

Все эксперименты проводили в двух сериях при трехкратном воспроизведении. Полученные результаты обрабатывали с использованием t-критерия Фишера – Стьюдента и представляли в виде средней арифметической и ее ошибки ($M \pm m$). Критерий вероятности $p < 0,05$ принимали достаточным для достоверной разницы опытной и контрольной групп данных.

Результаты исследования и обсуждение

Наращение удельного веса заболеваний, вызванных условно-патогенными микроорганизмами, связано с нарушением сложившегося баланса между организмом, его микрофлорой и окружающей средой обитания. При возникающем микроэкологическом дисбалансе происходит накопление в организме штаммов персистирующих потенциально-патогенных бактерий, способных при ослаблении защитных сил организма инициировать развитие инфекционного процесса и формировать резидентный тип носительства.

Установлено, что все изучаемые штаммы *Staphylococcus aureus* характеризовались значениями антилизоцимная активность в диапазоне $1,6 \pm 0,1$ - $2,7 \pm 0,2$ мкг/мл (средние значения $2,2 \pm 0,2$ мкг/мл). Все используемые в эксперименте штаммы золотистых стафилококков характеризовались полиантибиотикорезистентностью к наиболее часто используемым для лечения стафилококковых инфекций антибактериальным препаратам: пенициллинам (ампициллин, оксацилин), макролидам (эритромицин), хлорамфениколам (левомицетин), аминогликозидам (гентамицину) и фузидину.

Эфирные масла оказывали разнонаправленное (подавляющее или стимулирующее) действие как на экспрессию, так и на распространенность фактора персистенции микроорганизмов.

Эфирные масла базилика, пихты и чайного дерева оказывали подавляющее действие на экспрессию антилизоцимной активности в $55,0-60,0 \pm 4,1$ % (\downarrow). При этом летучие компоненты эфирного масла чайного дерева оказывали наиболее выраженное ингибирующее

действие на экспрессию антилизоцимной активности, снижая уровень признака у штаммов стафилококков в 1,5 раза ($2,2 \pm 0,2$ мкг/мл в контроле против $1,5 \pm 0,1 \downarrow$ мкг/мл в опыте). Компоненты эфирных масел лимона, мандарина и эвкалипта проявляли подавляющий эффект только в $40 \pm 4,1\% (\downarrow)$ случаев, при этом уровень экспрессии антилизоцимной активности снижался на $0,2-0,3$ мкг/мл и составлял $1,9-2,0 \pm 0,2$ мкг/мл. Стимулирующее действие на персистентные свойства все эфирные масла оказывали в сходном проценте случаев ($15,1 \pm 3,0\% - 25,7 \pm 3,6\% \uparrow$), отмечалось незначительное (на $0,3-0,5$ мкг/мл) повышение уровня антилизоцимной активности.

Таким образом, летучие компоненты эфирных масел чайного дерева, пихты, базилика в 1,5 раза чаще, по сравнению с другими изучаемыми маслами, оказывали заметное ингибирующее действие на экспрессию антилизоцимной активности золотистых стафилококков, при этом наблюдалось снижение экспрессии признака на $0,7$ мкг/мл. Полученные данные согласуются с результатами других исследователей о разнонаправленном влиянии эфирных масел на биологические свойства стафилококков. Эфирные масла представляют собой сложную смесь, состоящую из нескольких сот компонентов, деструктивно действуют на цитоплазматические мембраны микроорганизмов, снижают их проницаемость, уменьшая активность аэробного дыхания микробов, т.е. наблюдается их антибиотическое влияние через модификацию среды организма [9].

При оценке влияния синтетических индукторов эндогенного интерферона на распространенность антилизоцимной активности микроорганизмов наблюдался равнозначный угнетающий эффект в отношении следующих лекарственных препаратов: Циклоферон, Неовир и Полудан ($85,0 \pm 10,3\% \downarrow$). Препарат Амиксин характеризовался индифферентным действием на антилизоцимный признак изученных штаммов золотистых стафилококков.

При изучении модифицирующего экспрессию антилизоцимной активности стафилококков действия препаратов, индуцирующих эндогенный интерферон, были получены результаты, указывающие на ингибирующий эффект изученных веществ. Проведенный анализ показал, что самый высокий уровень ингибирования антилизоцимной активности приходился на представителей из класса акридонов – Неовир ($61,0 \pm 10,9\% \downarrow$) и Циклоферон ($63,8 \pm 8,8\% \downarrow$).

Вещества синтетического происхождения, имеющие другие химические структуры, такие как Амиксин и Полудан, обладали менее выраженным ингибирующим эффектом на персистентные свойства *Staphylococcus aureus* ($49,8 \pm 11,2\% \downarrow$ и $67,4 \pm 8,6\% \downarrow$ соответственно).

Таким образом, с применением фотометрических методов были изучены изменения в пенетрантности и экспрессии антилизоцимной активности штаммов *Staphylococcus aureus* под

действием ряда лекарственных препаратов, используемых для лечения бактериальных инфекций верхних дыхательных путей. Установлено, что у штаммов *Staphylococcus aureus*, являющихся представителями патocenоза слизистой оболочки дыхательной системы, происходит ингибирование антилизозимной активности под действием изученных лекарственных препаратов. При этом анализ фактического материала показал, что интенсивность подавления факторов персистенции штаммов *Staphylococcus aureus* различалась в зависимости от происхождения и химического состава препарата – наиболее выраженный эффект наблюдался при действии летучих компонентов эфирных масел чайного дерева и пихты и индукторов из класса акридонов.

Заключение

Среди наиболее интенсивно разрабатываемых в последние годы лекарственных средств особую значимость приобретают препараты, включающие механизмы естественного (врожденного) иммунитета (интерфероны и их индукторы). Таким критериям отвечают препараты, обладающие иммуномодулирующими свойствами, такие как индукторы эндогенного интерферона и эфирные масла, полученные из природного сырья. Данные препараты являются малотоксичными для организма хозяина – человека, а патогенные и условно-патогенные микроорганизмы не вырабатывают устойчивости к ним, что может служить преимуществом данных веществ перед другими антибактериальными препаратами, в том числе и антибиотиками.

Проведенные исследования показали возможность расширения в медицинской практике арсенала высокоактивных и малотоксичных лекарственных средств, используемых для более эффективной борьбы с бактериальными инфекциями, вызванными высоковирулентными и полиантибиотикорезистентными штаммами золотистых стафилококков, за счет двойной направленности действия препаратов: с одной стороны, это стимуляция механизмов естественной иммунологической защиты организма, а с другой – влияние на биологические свойства патогена.

Предлагаемый в работе подход может стать универсальным и быть использованным в отношении других патогенных и условно-патогенных микроорганизмов, паразитирующих в различных биотопах тела человека. Его применение на практике поможет разработать новые методы профилактики бактерионосительства патогенных микроорганизмов и лечения инфекционных заболеваний, вызываемых ими.

Список литературы

1. Азнабаева Л. М. Микробиологические критерии диагностики хронического тонзиллита у часто болеющих детей / Л. М. Азнабаева, Б. Я. Усвяцов // Педиатрия им. Сперанского. – 2012. – Т. 91, № 2. – С. 57-61.
2. Акатов А. К. Стафилококки / А. К. Акатов, В. С. Зуева. – М.: Медицина, 1983. – 278 с.
3. Бухарин О. В. Бактерионосительство (медико-экологический аспект) / О. В. Бухарин, Б. Я. Усвяцов. – Екатеринбург: УрО РАН, 1996. – 206 с.
4. Бухарин О. В. Персистенция микроорганизмов / О. В. Бухарин. – Екатеринбург: УрО РАН, 1999. – 366 с.
5. Бухарин О. В. Связь биологических свойств стафилококков с течением гнойных синуситов / О. В. Бухарин, О. Л. Чернова, С. Б. Киргизова и др. // Вестник оториноларингологии. – 1998. – № 5. – С. 16-18.
6. Дерябин Д. Г. Стафилококки: экология и патогенность / Д. Г. Дерябин. – Екатеринбург: УрО РАН, 2000. – 239 с.
7. Киргизова С. Б. Факторы персистенции *Staphylococcus aureus* под воздействием препаратов индукторов эндогенного интерферона / С. Б. Киргизова // Фундаментальные исследования. – 2012. – № 11/2. – С. 296-298.
8. Кириллов Д. А. Лекарственная регуляция персистентных свойств микроорганизмов: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. – Оренбург, 2004. – 22с.
9. Халдун А. О. Антибактериальное действие эфирных масел некоторых растений / А. О. Халдун // Журнал микробиол. – 2006. – №3. – С.92-93.
10. Хуснутдинова Л. М. Микрофлора слизистой оболочки миндалин человека в норме и при патологии / Л. М. Хуснутдинова / Журнал микробиол. – 2006. – № 1. – С. 60-63.

Рецензенты:

Чайникова Ирина Николаевна, д-р мед. наук, профессор кафедры микробиологии, вирусологии, иммунологии ГБОУ ВПО «Оренбургская государственная медицинская академия» Минздравсоцразвития РФ, г. Оренбург.

Фадеев Сергей Борисович, д-р мед. наук, доцент кафедры госпитальной хирургии, урологии ГБОУ ВПО «Оренбургская государственная медицинская академия» Минздравсоцразвития РФ, г. Оренбург.