

СИНТЕЗ ЛИЗОЦИМА И ЕГО ИНАКТИВАЦИЯ МИКРООРГАНИЗМАМИ, ВЫДЕЛЕННЫМИ ОТ БОЛЬНЫХ С РАЗЛИЧНЫМИ НОЗОЛОГИЧЕСКИМИ ФОРМАМИ

Бойко О.В.^{1,2}, Ахминеева А.Х.¹, Гудинская Н.И.¹, Бендюг В.А.²

¹ГБОУ ВПО «Астраханская государственная медицинская академия», Астрахань, oboyko08@rambler.ru

²ФГБОУ ВПО «Астраханский государственный университет», Астрахань

Оценивая полученные нами результаты по изучению лизоцимной (ЛА) и антилизоцимной активностей (АЛА) микроорганизмов при различных нозологических формах, было установлено, что разного рода микст-инфекции и аллергические заболевания, сопровождающиеся хронической инфекционной патологией, характеризуются персистенцией бактерий с определенным биохимическим профилем независимо от вида и локализации возбудителя. К такого рода метаболическим маркерам следует отнести лизоцимную и антилизоцимную активности микроорганизмов. Смысловая нагрузка приобретения этих факторов бактериями – обеспечить себя дополнительным механизмом выживания, «расчищая» экологическую нишу в условиях внутриклеточного паразитирования. Это объясняется тем, что существенным условием формирования резидентного бактерионосительства является способность многих патогенных видов бактерий паразитировать внутри клеток. Наличие высоких цифр ЛА и АЛА у бактерий, выделенных от больных с хроническими, крайне трудно поддающимися заболеваниями, подтверждает эффективность ЛА и АЛА в качестве средств, позволяющих микроорганизмам создавать оптимальные для себя условия существования.

Ключевые слова: лизоцим, инактивация лизоцима, микроорганизмы, инфекции.

SYNTHESIS OF LYSOZYME AND ITS INACTIVATION OF MICROORGANISMS ISOLATED FROM PATIENTS WITH VARIOUS NOSOLOGICAL FORMS

Boyko O.V.^{1,2}, Ahmineeva A.K.¹, Gudinskaya N.I.¹, Bendyug V.A.²

¹Astrakhan State Medical Academy, the Ministry of Health of Russia, Astrakhan, e-mail oboyko08@rambler.ru

²Astrakhan State University, Astrakhan

Evaluating our results on the study synthesis of lysozyme (LA) and the activities of anti-lysozyme (ALA) of microorganisms in different nosological forms, it was found that all sorts of mixed infections and allergic diseases accompanied by chronic infectious pathology characterized by the persistence of the bacteria with a specific biochemical profile, irrespective of the type and localization of the pathogen. This sort of metabolic markers should include lysozyme and antilysozyme microbial activity. Semantic load of the acquisition of these factors by bacteria – to provide themselves with an additional mechanism for survival, "clearing" in the environmental conditions of intracellular parasitism. This is because an essential condition for the formation of bacteria resident is the ability of many pathogenic bacteria species parasitize inside cells. The presence of high numbers LA and ALA in bacteria isolated from patients with chronic, extremely diseases are difficult to confirm the effectiveness of LA and ALA as a means of allowing microorganisms to create optimal living conditions for themselves.

Keywords: lysozyme, inactivation of lysozyme microorganism infection.

Лизоцим относится к классу ферментов-мурамидаз (КФ 3.2.1.17), субстратом действия которых являются полисахариды клеточной стенки бактерий, где лизоцим расщепляет b(1-4)-гликозидные связи N-ацетилглюкозамина и N-ацетилмурамовой кислоты. Бактериальный лизоцим близок по своим свойствам к яичному. Как известно, впервые бактериальный лизоцим был обнаружен А. Fleming (1922), который наблюдал растворение микрোকкока разведенным экстрактом стафилококковой культуры [1,2].

В настоящее время лизоцимная активность (ЛА) выявлена у микроорганизмов различных таксономических групп: грибов, простейших, бактерий и вирусов [1,3,4].

Способность бактерий специфически инактивировать лизоцим хозяина определена О.В. Бухариным с соавт. (1982) как их антилизоцимная активность (АЛА) и оценена в персистенции микроорганизмов. Выяснилось, что этот признак встречается у большого количества видов микроорганизмов, преимущественно у грамотрицательных бактерий – в 88–100 % случаев [3].

Экспериментальным путем на животных, культуре ткани и методом популяционного анализа доказано, что антилизоцимный признак можно рассматривать как маркер персистенции бактерий, способных к внутриклеточному паразитированию. Изучение генетической природы признака позволило определить плазмидный профиль ДНК, кодирующий антилизоцимную активность у клебсиелл с молекулярной массой 60 мД [3,4].

Доказано, что антилизоцимный признак бактерий является конструктивным, секретуемым фактором, специфически взаимодействующим с лизоцимом и инактивирующим его. Этот антилизоцимный фактор выделен из *E. coli* 0—114 и *Kl. pneumoniae* 22—110, определена его химическая природа – термостабильный анионный белок с молекулярной массой 21 кД, инактивируемый трипсином. Изучена генетическая природа признака, позволившая определить плазмидный профиль ДНК, кодирующий антилизоцимную активность у клебсиелл с молекулярной массой 60 мД. Ген АЛА *K. pneumoniae* оказался конъюгативной плазмидой, которую передавали в штаммы *E. coli*, *Shigella*, *Yersinia*, *Salmonella*, *Enterobacter*, *Proteus* и другие виды энтеробактерий. Передача АЛА плазмиды сообщала штаммам устойчивость к перевариванию в макрофагах. При передаче плазмиды, детерминирующей АЛА энтеробактерий, трансконъюгаты одновременно с маркером A_{12}^{+} приобретали устойчивость к канамицину, ампициллину, тетрациклину, стрептомицину, хлорамфениколу и сульфаниламидным препаратам и инактивирующим его [3,5].

Смысловая нагрузка приобретения этого фактора бактериями – обеспечить себя дополнительным механизмом выживания, «расчищая» эконишу в условиях внутриклеточного паразитирования. Это становится особенно понятным, если принять во внимание, что существенным условием формирования резидентного бактерионосительства является способность многих патогенных видов бактерий паразитировать внутри клеток [1,5].

Материалы и методы. Наличие лизоцимной и антилизоцимной активности у микроорганизмов оценивалось по методике, предложенной О.В. Бухариным с соавт. с

использованием *Micrococcus lysodeicticus* [3]. Микроорганизмы для исследований выделялись от пациентов с различными нозологическими формами и были типичными по своим свойствам.

Результаты и обсуждение

Лизоцимная активность культур клебсиелл, выделенных от больных детей с диагнозом «Внутриутробная инфекция» (ВУИ), в среднем составила 0,507 мкг/мл, а без этого диагноза – 1,737 мкг/мл. Различия между двумя выборками достоверны. Также достоверна разница между этими выборками и в отношении антилизоцимной активности. В первой группе средняя величина признака составила 0,697 мкг/мл, а во второй – 1,422 мкг/мл.

Представляют также интерес проведенные нами исследования по изучению системы «лизоцим-антилизоцимная активность» клебсиелл от больных с дисбактериозом, у которых имеются явные нарушения в микробиоценозе кишечника в сравнении с клебсиеллами, выделенными от людей, не имеющими этого диагноза. Установлено, что в дисбиотической группе ЛА культур (среднее значение 2,426 мкг/мл) с достоверностью $p < 0,05$ превышает таковую у культур из контрольной группы (среднее значение 0,587 мкг/мл). АЛА культур в обеих групп также имеет достоверные различия.

Оценивая полученные нами результаты по изучению ЛА и АЛА микроорганизмов при других нозоформах, следует отметить, что разного рода микст-инфекции и аллергические заболевания, сопровождающиеся хронической инфекционной патологией, характеризуются персистенцией бактерий с определенным биохимическим профилем независимо от вида и локализации возбудителя и протекают, как правило, в хронической форме. Выявленные нами статистически достоверные различия между бактериями, выделенными от здоровых лиц и больных, подтверждают это (таблица 1).

Нами было проведено исследование по изучению ЛА и АЛА у стафилококков, выделенных из носоглотки детей, находящихся на лечении в отделении иммунокоррекции. Контролем для них служили стафилококки от здоровых детей одного из детских садов г. Астрахани.

Всех детей из стационара, у которых были выделены стафилококки, мы разделили на три группы. В первую входили пациенты с диагнозом «Рецидивирующая вирусная инфекция верхних дыхательных путей». Во вторую – дети с различными аллергическими заболеваниями (бронхиальная астма, аллергоз, атопический дерматит и т. д.). В третью – дети, у которых выделение стафилококков сочеталось с хламидийной инфекцией верхних дыхательных путей.

Результаты были следующие: наиболее активно продуцировали лизоцим стафилококки контрольной группы. Среднее значение составило 6,864 мкг/мл, что существенно выше, чем у стафилококков, выделенных от больных с рецидивирующей вирусной инфекцией – 0,001 мкг/мл ($p < 0,0001$) и стафилококков от детей с аллергическими заболеваниями, где лизоцимная активность составляла 0,760 мкг/мл ($p < 0,0001$); оно же было выше, чем у больных с микст-инфекцией из третьей группы, где средняя лизоцимная продукция стафилококков равнялась 2,047 мкг/мл ($p < 0,05$).

В последней группе и АЛА у бактерий также ниже по сравнению с контрольным вариантом, хотя различия и недостоверны. АЛА в контрольной группе составляла 0,341 мкг/мл, а у больных с хламидиозом выделенные стафилококки инактивировали 0,204 мкг/мл. При этом картина в первой и второй выборке по сравнению с контрольной совершенно иная. Так, у больных с рецидивирующей вирусной инфекцией АЛА выделенных стафилококков составила 2,826 мкг/мл против 0,341 мкг/мл в контроле ($p < 0,002$). Выше АЛА и у бактерий от детей с аллергической патологией – она составила 1,879 мкг/мл ($p < 0,05$).

В результате проведенных нами исследований установлено, что стафилококки, выделенные из спермы человека, обладали как лизоцимной, так и антилизоцимной активностью. Среди культур, являющихся носителями этого признака, среднее значение ЛА равнялось 3,54 мкг/мл, а АЛА – 3,36 мкг/мл. Достоверно установлено, что независимо от видовой принадлежности выделение бактерий, относимых по классификации О.В. Бухарина к резидентным штаммам (наличие у *Staphylococcus aureus* антилизоцимной активности, превышение АЛА у *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus saprophyticus* границы 6 мкг/мл) сопровождалось увеличением количества лейкоцитов в сперме от 4 до 6 в поле зрения, в то время как нормальные показатели составляют 0–1 лейкоцит [3].

Полученные нами факты подтверждаются и другими исследованиями. В работах, выполненных в Институте клеточного и внутриклеточного симбиоза и областном центре планирования семьи и репродукции г. Оренбурга, установлено, что микрофлора здоровых мужчин характеризовалась низким значением АЛА. Абсолютное значение АЛА не превышало 1 мкг/мл, а средние значения составляли $0,5 \pm 0,4$ мкг/мл. Высказывается предположение, что низкие уровни инактивации нормофлорой лизоцима являются достаточными для защиты от бактерицидного действия последних, обеспечивая, таким образом, стабильность микробиоценозов. В то же время при персистирующей инфекции свойства нормальной микрофлоры, вероятно, могут изменяться. Средний уровень АЛА у больных с урогенитальной патологией составил $3,3 \pm 0,7$ мкг/мл.

Таблица 1

Лизоцимная и антилизоцимная активность микроорганизмов ($M \pm m$, мкг/мл, достоверность различий (p))

Диагноз пациента/ Тестируемый микроорганизм	Лизоцимная активность		p	Антилизоцимная активность		p
	Больные	Контроль		Больные	Контроль	
ВУИ/ клебсиеллы	0,507±0,06	1,737±0,05	<0,05	0,697 ±0,08	1,422±0,09	<0,05
Дисбактериоз кишечника/клебсиеллы	2,426±0,03	0,587±0,052	<0,05	0,072±0,004	1,127±0,081	<0,05
Рецидивирующая вирусная инфекция верхних дыхательных путей/стафилококки	0,001±0,00002	6,864±0,089	<0,0001	2,826±0,032	0,341±0,005	<0,002
Аллергозы/стафилококк	0,760±0,03	6,864±0,089	<0,0001	1,897±0,07	0,341±0,005	<0,05
Хламидийная инфекция верхних дыхательных путей/стафилококки	2,047±0,04	6,864±0,089	<0,05	0,204±0,023	0,341±0,005	>0,05
Хр. простатит/стафилококк	3,54±0,8	1,0±0,04	<0,01	3,36±0,75	0,6±0,02	<0,01

Выводы

Наличие высоких цифр ЛА и АЛА у бактерий, выделенных от больных с хроническими, крайне трудно поддающимися заболеваниями урогенитальной сферы, детей с рецидивирующей вирусной инфекцией, хламидиями, аллергическими болезнями, а также у новорожденных с различной патологией, находящихся на лечении после выписки из родильного дома, позволяют нам констатировать эффективность ЛА и АЛА в качестве средств, позволяющих микроорганизмам создавать оптимальные для себя условия существования внутри организма человека.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РГНФ в рамках проведения научных исследований по проекту № 13-06-00008 «Повышение качества жизни больных хроническим простатитом: медицинский и социальный аспекты».

Список литературы

1. Бойко О.В., Терентьев А.А., Николаев А.А. Молекулярные механизмы персистирующей инфекции. – Астрахань: Издательский дом «Астраханский университет», 2006.
2. Бойко О.В., Терентьев А.А., Николаев А.А. Клин. лаб. диагностика. – 2009. – № 3. – С.43-46.
3. Бухарин О.В. Бактерионосительство / О.В. Бухарин, Б.Я. Усвятцов. – Екатеринбург: УрО РАН, 1996. – 207 с.
4. Tabor C.W., Tabor H (1994) Polyamines // Annu. Rev. Biochem. – Vol.53. – P.749-790.
5. Wertheim H.F., Vos M.C., Ott A.C. Risk and outcome of nosocomial Staphylococcus aureus bacteraemia in nasal carriers versus non-carriers. Lancet. 2004 Aug 21; 364(9435):703-5.

Рецензенты:

Николаев А.А., д.м.н., профессор, зав. кафедрой общей и биорганической химии ГБОУ ВПО «Астраханская государственная медицинская академия» Минздрава России, г. Астрахань;

Кривенцев Ю.А., д.м.н., доцент кафедры биохимии с курсом КЛД ГБОУ ВПО «Астраханская государственная медицинская академия» Минздрава России, г. Астрахань.