

**ТРУДЫ НАЦИОНАЛЬНОГО НАУЧНО-
ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОГО ИНСТИТУТА МЕДИЦИНСКОЙ
ПРОФИЛАКТИКИ ИМ. В.АХУНДОВА
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ АЗЕРБАЙДЖАНА**

ТОМ I

**AZƏRBAYCAN SƏHIYYƏ
NAZİRLİYİNİN V.AXUNDOV ADINA
MİLLİ ELMİ-TƏDQIQAT TİBBİ
PROFİLAKTIKA İNSTİTUTUNUN
ELMİ ƏSƏRLƏRİ**

I CİLD

**TRANSACTION OF THE NATIONAL RESEARCH INSTITUTE
OF MEDICAL PROPHYLAXIS NAMED AFTER V.AKHUNDOV
OF MINISTRY HEALTH OF AZERBAIJAN**

VOLUME I

**«Nasir» nəşriyyatı
Bakı - 2007.**

О ВОЗМОЖНОСТИ ОБРАЗОВАНИЯ ГОСПИТАЛЬНЫМИ ШТАММАМИ *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* НЕСКОЛЬКИХ ГЕМОЛИТИЧЕСКИХ СУБСТАНЦИЙ РАЗЛИЧНОЙ ПРИРОДЫ. НЕИДЕНТИФИЦИРОВАННЫЕ ГЕМОЛИЗИНЫ

А.Э. Пыж, В.Н. Никандров

НИИ эпидемиологии и микробиологии Минздрава Республики Беларусь, Минск, Беларусь

Инфекции, вызываемые *Pseudomonas aeruginosa*, остаются актуальной проблемой ряда отраслей современной медицины. Начиная с 70-х годов XX века *P. aeruginosa* становится одним из основных возбудителей локальных и системных гнойно-воспалительных процессов, особенно в условиях стационаров [2]. Несмотря на прогресс, достигнутый в изучении биологических свойств этого возбудителя и расшифровке патогенеза инфекционного процесса, существующие представления о молекулярных аспектах патогенности *P. aeruginosa* не являются исчерпывающими [1]. Патогенное действие *Pseudomonas aeruginosa* осуществляется через комплекс экзопродуктов: пигментов, энзимов, токсинов. Многофакторная природа патогенности обеспечивает этим бактериям неуязвимость практически против любых защитных систем макроорганизма - естественных (тканевые барьеры, гуморальный и клеточный иммунитет), искусственных (иммунопрепараты, антибиотики), а также дезинфектантам. Так, микроорганизм продуцирует экзотоксин А - термолабильный белок мол.массой 66-72 Ша. Полагают, что механизм токсического действия связан с модификацией фактора элонгации посредством АДФ-рибозилирования, что ведет к блокаде синтеза белка на стадии элонгации. Экзоэнзим S - термостабильный белок с АДФ-трансферазной активностью. Инактивируется под действием денатурирующих и восстанавливающих агентов, ионов Cu^{2+} и Fe^{2+} , образуется в двух формах: в виде энзиматически активного белка мол.-массой 49 Ша; и неактивного пробелка мол. массой 53 Ша. Экзоэнзим S ингибирует биосинтез белка и проявляет цитотоксичность в отношении легочной ткани. Цитотоксин оказывает выраженное цитотоксическое действие на полиморфно-ядерные нейтрофилы, способствует раз-

виту нейтропении, вызывает повышение проницаемости клеточных мембран, что обуславливает набухание клеток и потерю ими крупных, например белковых молекул (4?5).

Среди эндотоксинов, образуемых синегнойной палочкой, выделяют энтеротоксический фактор белковой природы, фактор проницаемости и нейраминидазу, которая способна в 2-3 раза усиливать действие других токсинов синегнойной палочки.

Одним из существенных факторов патогенности микроорганизма является гемолизина. *P.aeruginosa* образует не менее двух гемолитических субстанций – термолабильный гемолизин с лецитиназной активностью (фосфолипаза С) и термостабильный гемолизин (гликолипид). Внеклеточный кислый гликолипид содержит две молекулы рамнозы и гидроксидекаиновою кислоту (8). По данным литературы и первый и второй гемолизины вызывают солюбилизацию и гидролиз фосфолипидов с образованием фосфорилхолинов. In vivo гемолизины приводят к развитию некротических поражений, особенно в печени и легких. Помимо внеклеточного гемолизина есть указания на существование внутриклеточного гемолизина, возможно появляющегося в фильтратах бульонных культур *P.aeruginosa* вследствие автолиза. Взаимоотношения между внеклеточными и внутриклеточными гемолизинами не установлены. Наряду с многочисленными публикациями о факторах патогенности *P.aeruginosa*, встречаются лишь единичные работы об изучении продукции и свойств ее гемолизинов, методам их очистки, характеру взаимоотношений различных видов гемолизинов при инфекционном процессе. Механизм действия этих гемолизинов остается также неясным (6).

Цель настоящей работы – оценить роль активных форм кислорода (АФК) и металлов переменной валентности в реализации лецитиназной и гемолитической активности внеклеточных субстанций *P.aeruginosa*.

Материалы и методы. Исследования проведены на 10 клинических штаммах *P.aeruginosa*, выделенных из патологического материала стационарных больных. Суточные культуры с агара пересекали во флаконы с МПБ и выращивали в течение 15-18 ч., затем пересекали во флаконы с 30 мл МПБ и выращивали в течение двух-четырех суток под ватно-марлевыми пробками при 30⁰С и 37⁰С. Клетки отделяли центрифугированием, культуральную жидкость в объеме 0,2 мл вносили в пробирку с фосфатным буфером рН 6,8 и

добавками перехватчиков АФК и комплексонов. В качестве источника лецитовителлина использовали 5%-ную эмульсию желтка куриного яйца в изотоническом растворе NaCl. Смесь инкубировали при 37°C в течение 2 ч. Реакцию учитывали по образованию четкого диглицеринового кольца. Всплывающего на поверхность пробы в результате ферментативного гидролиза лецитина куриного желтка. Гемолитическую активность фильтратов бульонных культур до и после кипячения (30 мин на водяной бане) оценивали по лизису 2%-ной взвеси бараньих эритроцитов после инкубации при 37°C в течение 2 ч и высвобождению гемоглобина, которое учитывали по величине абсорбции при 540 нм. Комплексоны и перехватчики АФК вносили в концентрации 0,001М

Результаты и их обсуждение. Проведенные нами исследования показали, что наибольшая фосфолипазная активность наблюдается при культивировании бульонных культур в течение 96 ч при 30 °С, а гемолитическая активность - при культивировании при 37 °С в течение трех суток. Перехватчики синглетного кислорода (азид натрия, гистидин, триптофан) умеренно - на 25-45% угнетали расщепление лецитина и лизис взвеси бараньих эритроцитов супернатантом бульонных культур (рисунок). Близкий по величине эффект вызвали перехватчики гидроксильного радикала - маннит и формиат натрия. В присутствии перехватчика супероксидного радикала - нитротетразоливого синего - фосфолипазная активность подавлялась полностью, а гемолитическая - лишь на 24-45%. Комплексоны: о-фенантролин, 8-оксихинолин, но не диэтилдитиокарбамат натрия (ДЭДТК натрия); вызвали практически полное подавление фосфолипазной активности, а гемолитической активности - до 50% лишь у некоторых штаммов (3), тогда как по отношению к большинству штаммов они явились активатором гемолиза эритроцитов, что позволяет думать о важной роли в проявлении фосфолипазной активности металлов переменной валентности, возможно Fe^{III}.

По-видимому в реализации этой активности важную роль играют АФК, особенно супероксидный радикал (возможно, эндогенного характера), образующиеся с участием металлов переменной валентности. Ранее сходная, хотя и не идентичная картина была описана нами для гемолитической активности стрептолизина О, который лишен фосфолипазной активности [3]. *Pseudomonas aeruginosa* же образует две фосфолипазы С (гемолитическую PLC-H и негемолитическую PLC-N). Экспрессия генов обеих фосфолипаз регулируется не-

органическим фосфатом. По механизму токсического действия, принятому в литературе, гемолитическая фосфолипаза С преимущественно гидролизует фосфолипиды, содержащие четвертичные аммонийные группы. Такие ли-пиды обнаружены в эукариотических мембранах и легочном сурфактанте [6,7]. PLC-N не обладает гемолитической активностью вследствие неспособности атаковать фосфолипиды, организованные в мембраноподобные структуры на поверхности эритроцитарных мембран [7].

Влияние перехватчиков афк, комплексонов и кипячения на фосфолипазную активность культуральной жидкости

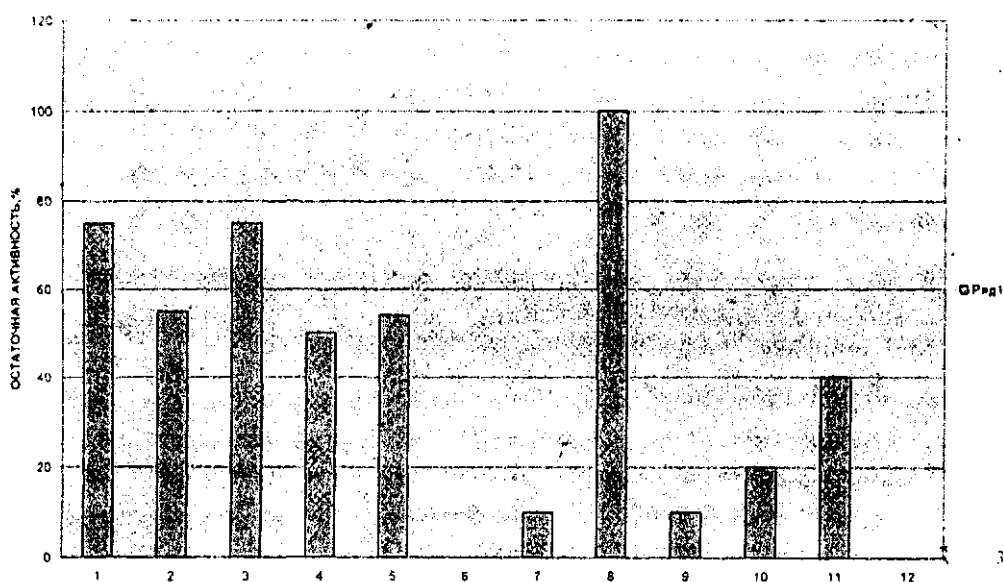


Рис. Влияние перехватчиков активных форм кислорода и комплексонов и кипячения на фосфолипазную активность супернатантов бульонной культуры *P. aeruginosa*. 1-азид натрия; 2-гистидин; 3-триптофан; 4-маннит; 5-формиат натрия; 6 - нитротетразолиевый синий 7-о-фенаantroлин; 8-ДЭДТК натрия; 9-о-ксихинолин; 10-ЭДТА; 11-КэРе(СЫ)б., 12-кипячение.

Кипячение супернатантов бульонных культур приводит к полной утрате фосфолипазной активности и снижению гемолитической активности у некоторых штаммов на 15-60%. На чашках с кровавым агаром у большинства штаммов до кипячения отмечался р-гемолиз, что является следствием проявления, скорее всего, фосфолипазной активности, но не гемолизина, так как данный агент очень чувствителен к сыворотке крови. Тем не менее, после кипячения только у пяти штаммов гемолитическая активность полностью уничтожается.

У части же штаммов отмечаются зоны α -гемолиза, сохраняется до 50% исходной гемолитической активности. Этот остаточный термо-резистентный гемолиз лишь использованные перехватчики гидро-кислого радикала - маннит и формиат натрия угнетали на 20-30%. Все остальные перехватчики и комплексоны активировали такой гемолиз в два раза (не показано). Это довольно парадоксальный эффект, ранее не описанный в литературе, сущность которого пока остается неясной.

Более того, нами получены материалы о том, что при образовании большого количества пигмента пирроцианина гемолитическая активность супернатантов бульонных культур *P.aeruginosa* резко усиливается. Следовательно, реализация гемолитической активности в последних случаях обусловлена не фосфолипазой C, что может свидетельствовать о существовании иных гемолитических субстанций, природа которых требует дальнейших исследований.

Литература

1. Красильников А.П., Романовская Т.Р. Микробиологический словарь - справочник. Минск: Асар, 1999; с. 310-1.
2. Медицинская микробиология. Под ред. В.И.Покровского, О.К.Поздеева. М.: ГОЭТАР МЕДИЦИНА, 1998; с. 183-192.
3. Никандров В.Н., Лапушкина Т. Н. Механизм цитолитического действия стрептолизина О: Влияние перехватчиков активных форм кислорода и комплексонов на гемолиз эритроцитов II Бюл. эксперим. биологии и медицины: -1993. -№ 3 стр.277-278.
4. Руководство по медицинской микробиологии. Под ред. Т.В.Перадзе. Пер. с англ. М.: Медицина, 1982; 2: 9-18.
5. Сидоренко С.В., Яковлев С.В. Инфекции в интенсивной терапии. М., 2000.
6. Berka R.M. Vasil M.L., IntJBiochem. 1994 Feb, 26(2): 155-62.
7. Rachel M. Ostroff, Adrianal. Int. J. Biochem. 1990 Oct., Vol. 172., No. 10.- 5915-5923.
8. Hauser G., and M.L. Karnovsky. 1954. Studies on the production of glycolipide by *Pseudomonas aeruginosa*. J. Bacteriology. 68: 645-654.

**P.AERUGINOSA-NIN HOSPITAL STRAINS OF
DIFFERENT ORIGIN UNIDENTIFIED HAEMOLYSINS
AND THEIR ROLE IN THE REALIZATION OF
LEUCINASE AND HAEMOLYTIC ACTIVITIES**

A.E.Pij, V.N.Nikandrov

*Belarusiya Sdhiyyd Nazirliyinin Elmi-Tddqiqat Epidemiologiya va Mikrobiologiya
Institutu, Minsk, Belarusiya*

Hazırki işin məqsədi – oksigenin aktiv forması və dəyişkən valentli metalların P.aeruginosa-nın hüceyrədənənar substansiyalarının leucinaza və hemolitik aktivliklərinin reallaşmasında rolunun qiymətləndirilməsidir.

Bizim tərəfdən alınan məlumatlar göstərir ki, çoxlu miqdarda piosionin pigmentinin əmələ gəlməsi zamanı P.aeruginosa bulyonunun supernatantının hemolitik aktivliyi kəskin yüksəlir.

**THE POSSIBILITIES FORMING BY HOSPITAL STRAINS OF
PSEUDOMONAS AERUGINOSA SOME HAEMOLYTIC SUBSTANCES OF
DIFFERENT ORIGIN UNIDENTIFIED HAEMOLYSINS**

A.E.Pij, V.N.Nikandrov

*The scientific research institute of epidemiology and microbiology of Ministry Health
of Belarusiya, Minsk, Belarusiya*

The aim of this work to mark of role of active forms O_2 and metals in realization of leucinase and haemolytic activities of outcell substance of P.aeruginosa. We had the data that in forming of large quantity of pigment of piosianine the haemolytic activity of supernatant of P.aeruginosa sharply increases.