

УЧРЕДИТЕЛИ:  
ВСЕРОССИЙСКОЕ НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКОЕ ОБЩЕСТВО  
ЭПИДЕМИОЛОГОВ, МИКРОБИОЛОГОВ И ПАРАЗИТОЛОГОВ

СОЮЗ ПЕДИАТРОВ РОССИИ

ООО «С-ИНФО»

# ЖУРНАЛ МИКРОБИОЛОГИИ ЭПИДЕМИОЛОГИИ И ИММУНОБИОЛОГИИ

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ:

Главный редактор В. В. ЗВЕРЕВ, д.б.н., проф., акад. РАМН

Ю. В. АНАНЬИНА, д.м.н., проф., член-корр. РАМН; В. М. БОНДАРЕНКО, д.м.н., проф. (зам. гл. редактора); Н. И. БРИКО, д.м.н., проф., член-корр. РАМН; О. В. БУХАРИН, д.м.н., проф., акад. РАМН, член-корр. РАН; Ю. В. ВЕРТИЕВ, д.м.н., проф.; А. Л. ГИНЦБУРГ, д.м.н., проф., акад. РАМН; И. Н. ДЬЯКОВ, к.б.н. (науч. редактор); С. Г. ДРОЗДОВ, д.м.н., проф., акад. РАМН; О. И. КИСЕЛЕВ, д.м.н., проф., акад. РАМН; Л. В. КОВАЛЬЧУК, д.м.н., проф.; В. В. КУТЫРЕВ, д.м.н., проф., член-корр. РАМН; В. Ю. ЛИТВИН, д.б.н., проф., член-корр. РАМН (отв. секретарь); В. В. МАЛЕЕВ, д.м.н., проф., акад. РАМН; М. И. МИХАЙЛОВ, д.м.н., проф.; М. И. НАРКЕВИЧ; Г. Г. ОНИЩЕНКО, д.м.н., проф., акад. РАМН; В. И. ПОКРОВСКИЙ, д.м.н., проф., акад. РАМН; Р. И. СЕПИАШВИЛИ, д.м.н., проф., акад. АН Грузии; В. П. СЕРГИЕВ, д.м.н., проф., акад. РАМН; Ю. П. СОЛОДОВНИКОВ, д.м.н., проф.; Арег А. ТОТОЛЯН, д.м.н., проф.; Н. Н. ФИЛАТОВ, д.м.н., проф.; Н. Д. ЮЩУК, д.м.н., проф., акад. РАМН

*Двухмесячный научно-практический журнал*

*Основан в 1924 г.*

© А.Э.ПЫЖ, В.Н.НИКАНДРОВ, 2011

А.Э.Пыж, В.Н.Никандров

**ВКЛАД СИНЕ-ЗЕЛЕННЫХ ПИГМЕНТОВ PSEUDOMONAS AERUGINOSA В ГЕМОЛИТИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ КУЛЬТУРАЛЬНОЙ ЖИДКОСТИ**

НИИ эпидемиологии и микробиологии, Минск, Республика Беларусь

*Цель.* Оценить вклад сине-зеленых пигментов *Pseudomonas aeruginosa* в гемолитическую активность ее культуральной жидкости. *Материалы и методы.* Использовано 8 госпитальных штаммов и эталонный штамм ATCC 15442. Изучены динамика роста штаммов, а также особенности накопления гемолитической и фосфолипазной активности. Методами гель-хроматографии и экстракции хлороформом выделены очищенные образцы пиовердина и пиоцианина. Изучена их гемолитическая и лецитиназная активность, воздействие на эту активность перехватчиков активных форм кислорода и комплексонов. *Результаты.* Динамика накопления гемолитической активности при росте штаммов на жидкой питательной среде существенно отличалась от динамики накопления фосфолипазной активности. Хроматографическое отделение пигментов из супернатантов культуральной жидкости резко снижало ее гемолитическую активность. Очищенные образцы пиовердина и пиоцианина обладали способностью лизировать эритроциты и лецитин куриного яйца. Эти свойства пигментов подавлялись нитротетразолиевым синим и были чувствительны к комплексонам. *Заключение.* Пиовердин и пиоцианин патогенных штаммов *P. aeruginosa* способны лизировать эритроциты и суспензию очищенного лецитина куриного яйца,

A.E.Pyzh, V.N.Nikandrov

**CONTRIBUTION OF BLUE-GREEN PIGMENTS TO HEMOLYTIC ACTIVITY OF PSEUDOMONAS AERUGINOSA CULTURAL FLUID**

Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Minsk, Belarus

*Aim.* To assess the contribution of blue-green pigments of *Pseudomonas aeruginosa* to hemolytic activity of its cultural fluid. *Materials and methods.* Eight hospital strains and reference strain ATCC 15442 were used. Growth dynamics of strains as well as features of accumulation of hemolytic and phospholipase activity were studied. Purified samples of pyoverdin and pyocyanin were extracted by gel-chromatography and chloroform extraction methods. Hemolytic and lecithinase activities of the samples as well as effect of active oxygen scavengers and chelating agents on these activities were studied. *Results.* Dynamics of accumulation of hemolytic activity significantly differed from that of phospholipase activity when strains were grown in liquid medium. Chromatographic separation of the pigments from cultural fluid supernatants sharply reduced its hemolytic activity. Purified samples of pyoverdin and pyocyanin were capable to lyse erythrocytes and chicken egg lecithin. These characteristics of the pigments were inhibited by nitroblue tetrazolium and sensitive to chelating agents. *Conclusion.* Pyoverdin and pyocyanin of pathogenic strains of *P. aeruginosa* are capable to lyse erythrocytes and suspension of purified chicken egg lecithin, they contribute to total hemolytic activity of pathogenic strains of *Pseudomonas*, which is not determined only by phospholipase C produced by microorganism. Lytic activity of the pigments is blocked by nitroblue tetrazolium and

они вносят вклад в общую гемолитическую активность патогенных штаммов псевдомонад, которая не зависит всецело лишь от продуцируемой микроорганизмом фосфолипазы С. Литическая активность пигментов блокируется нитротетразолиевым синим и чувствительна к отдельным комплексонам. Повидимому, эта активность опосредована супероксидным радикалом и детерминирована присутствием в молекулах пигментов металлов с переменной валентностью.

Журн. микробиол., 2011, № 1, С. 19—25

**Ключевые слова:** *Pseudomonas aeruginosa*, гемолитическая активность, пиоцианин, пиовердин, лизис лецитина, активные формы кислорода

## ВВЕДЕНИЕ

В многочисленных публикациях последнего десятилетия подчеркивается весьма существенная этиологическая роль бактерий рода *Pseudomonas*, в особенности *Pseudomonas aeruginosa* как ведущего возбудителя внутрибольничных инфекций [14]. По современным представлениям патогенность синегнойной палочки детерминирована способностью к продукции комплекса экзопродуктов — токсинов, энзимов, пигментов. Принято считать, что эта бактерия образует не менее двух гемолитических субстанций — термолабильный гемолизин с лецитиназной активностью (фосфолипаза С) и термостабильный внутриклеточный гемолизин (рамнолипид), появляющийся в культуральной жидкости 2 — 3-недельных культур, возможно, в результате автолиза [8].

Ранее нами были получены предварительные данные о существовании в супернатантах культуральной жидкости госпитальных штаммов *P.aeruginosa* термостабильных внеклеточных гемолитических факторов, которые находились во фракции сине-зеленых пигментов [3].

Цель настоящей работы — оценить вклад сине-зеленых пигментов госпитальных штаммов *P.aeruginosa* в их гемолитическую активность.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовано 8 госпитальных штаммов *P.aeruginosa* (23/2<sub>гоб1</sub>, 23/2<sub>гоб2</sub>, 17/2<sub>р3</sub>, 74/5<sub>гоб3</sub>, 74/5<sub>гоб4</sub>, 91/2, 12/2<sub>р3</sub>, 13/3<sub>р3</sub>) (ЦНИЛ Белгосмедуниверситета), а также эталонный штамм ATCC 15442.

Монокультуру микроорганизма поддерживали на мясо-пептонном агаре («Himedia», Индия). Клетки с агара смывали пита-

susceptible to some chelating agents. Apparently, this activity is mediated by superoxide radical and determined by presence of metals with transient valence in pigments' molecules.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2011, No. 1, P. 19—25

**Key words:** *Pseudomonas aeruginosa*, hemolytic activity, pyocyanin, pyoverdin, lecithin lysis, active forms of oxygen

тельным бульоном на основе гидролизата кильки (НПО «Микроген», Махачкала), и засекали флаконы объемом 50 мл с питательным бульоном (30 мл). Инкулят высевали в дозе 0,5 млрд микробных тел/мл и культивировали в условиях аэрации на термостабируемой качалке (180 об/мин) при 37°C в течение 24 ч. Пробы культуральной жидкости отбирали каждые два часа. Биомассу отделяли центрифугированием при 3000 об/мин, супернатанты использовали для анализа.

Гемолитическую активность оценивали по лизису 2% взвеси бараньих эритроцитов в 0,05 М фосфатном солевом буфере рН 7,4 при 37°C в течение 2 ч, регистрируя выход гемоглобина из эритроцитов на спектофотометре Cary 100 Bio Variant при 540 нм [3, 8]. В ряде случаев гемолитическую активность определяли также по лизису эритроцитов в тонком слое агарового геля [6].

Фосфолипазную активность учитывали методом лизиса лецитина, выделенного из желтка куриных яиц в тонком слое агарового геля [7]. Инактивацию фосфолипазной (лецитиназной) активности проводили путем выдерживания проб в кипящей водяной бане в течение 30 мин.

Выделение пигментов фракций из супернатантов культуральной жидкости осуществляли методами экстракции хлороформом, диализа против 5-кратного объема дистиллированной воды при 4°C в течение 12 ч [12].

Гель-хроматографию супернатантов культуральной жидкости осуществляли, как описано в [8] на колонке с сефадексом G-25 размерами 10x0,6 см, уравновешенной 0,15 М раствором NaCl. Элюцию пигментных фракций проводили этим же раствором со

скоростью 100 мкл/мин, регистрируя величину абсорбции при 280, 450 нм (после добавления  $\text{FeCl}_3$  в конечной концентрации  $10^{-3}$  М для пиовердина) и 520 нм (после экстракции хлороформом 1:4 и последующей экстракции из хлороформной фазы 0,2 н  $\text{HCl}$  для пиоцианина).

Комплексоны и перехватчики активных форм кислорода вносили в агаровый гель в конечной концентрации  $10^{-3}$  М.

Содержание белка определяли по [10].

В экспериментах использовали о-фенантролин, кумасси голубой G-250, азид натрия («Serva», Германия), этилендиаминтетраацетат (ЭДТА, «Fluka», Швейцария), нитросиний тетразолий («Chemapol», Чехия), сефадекс G-25 («Pharmacia», Швеция), агар типа «Difko» (США). Формиат натрия, диэтилдитиокарбамат натрия, соли неорганических кислот,  $\text{NaOH}$ ,  $\text{HCl}$  квалификации «хч» или «чда» были производства стран СНГ, в случае необходимости их использовали после соответствующей дополнительной очистки.

Все эксперименты выполнены не менее чем четырехкратно. Результаты обработаны с помощью пакетов прикладных программ Statistica 6.0, Origin 6.1. путем подсчета выборочной средней арифметической (M), ошибки средней (mM).

#### РЕЗУЛЬТАТЫ

Ранее установлено, что при культивировании клеток госпитальных штаммов псевдомонад на питательном бульоне в отсутствие аэрации фосфолипазная активность проявлялась лишь через 96 ч культивирования, тогда как гемолитическая — через 72 ч [4]. Культуральная жидкость во всех случаях окрашивалась в интенсивный синезеленый цвет.

В условиях аэрации гемолитическая и фосфолипазная активность обнаруживались уже к 2 ч роста и возрастали в ходе развития культуры микроорганизма. Однако имелись расхождения в динамике этой активности. Так, у штамма 23/2<sub>гоб1</sub> в период 2 — 16 ч динамика роста фосфолипазной активности приближалась к прямолинейной, тогда как рост гемолитической активности описывался экспонентой. В период 6 — 10 ч рост гемолитической активности супернатантов культуры этого штамма составил 20%, а фосфолипазной — в два раза ( $P < 0,05$ ). Итоговый рост гемолитической активности к 24 ч по сравнению с 6 ч у этого штамма составил 95%, а фосфолипазной активности — 230%. Такие же расхождения обнаружены и у остальных штаммов.

Можно было бы думать, что лизис эритроцитарной мембраны фосфолипазой существенно осложнен в сравнении с эмульсией очищенного лецитина яйца. Однако супернатант штамма АТСС 15442 через 2 ч обладал практически идентичной активностью на эритроцитарном и лецитиновом агарах. Динамика же накопления гемолитической и фосфолипазной активности различалась — конечный прирост гемолитической активности составил 67%, а фосфолипазной — 350% в сравнении с их уровнем через 2 ч. Это обстоятельство, также как и упомянутые выше полученные ранее результаты, дают основания полагать, что внеклеточная гемолитическая активность микроорганизма обусловлена не только активностью фосфолипазы.

В предыдущих исследованиях нами было показано, что после прогревания в кипящей водяной бане супернатантов культуральной жидкости штаммов 74/5<sub>гоб4</sub>, 23/2<sub>гоб1</sub>, 23/2<sub>гоб2</sub> их фосфолипазная активность полностью уничтожалась, а на кровяном агаре проявлялась остаточная гемолитическая активность — 10% исходной (или 40 — 85% в тесте лизиса взвеси эритроцитов) — терморезистентный гемолиз [4]. Более того, судя по данным литературы гемолиз кровяного агара не связывают с действием термостабильного рамнолипида, поскольку он инактивируется белками плазмы крови [13].

То обстоятельство, что остаточная терморезистентная гемолитическая активность была во всех случаях сопряжена с интенсивным синезеленым окрашиванием супернатантов, явилось побудительной причиной исследований роли синезеленых пигментов в проявлении указанной активности.

Результаты гель-фильтрации показали, что после пропускания через сефадекс супернатанты культур микроорганизма утрачивали синезеленую окраску (пигменты задерживались на колонке), а гемолитическая активность снижалась в 2,1 — 12,2 раза (табл. 1). Между тем, в экстрактах агаровой культуры патогенных штаммов микроорганизма после отделения пигментов не наблюдали потери гемолитической активности [8].

Фракции синезеленых пигментов госпитальных штаммов *P.aeruginosa* были выделены из супернатантов культуральной жидкости штамма 23/2<sub>гоб1</sub> на колонке сефадекса. При элюции образцов раствором хлорида натрия с колонки в свободном объеме выходила бесцветная белоксодер-

Таблица 1. Гемолитическая активность супернатантов штаммов *P.aeruginosa* до и после отделения пигментной фракции при гель-фильтрации

Штамм	Гемолитическая активность, %		Штамм	Гемолитическая активность, %	
	До отделения пигментов	После отделения пигментов		До отделения пигментов	После отделения пигментов
23/2 <sub>Гоб1</sub>	91,1±8,9	13,6±0,3*	12/2 <sub>р3</sub>	66,0±3,4	30,8±0,8*
23/2 <sub>Гоб2</sub>	76,8±12,5	6,3±0,3*	13/3 <sub>р3</sub>	76,8±0,2	26,6±3,4*
17/2 <sub>р3</sub>	100,0±0,0	47,5±2,5*	91/2	46,0±4,5	6,8±0,2*
74/5 <sub>Гоб4</sub>	61,9±11,9	7,3±0,65*			

Примечание. \*Достоверные различия по сравнению контролем,  $P \leq 0,05$ .

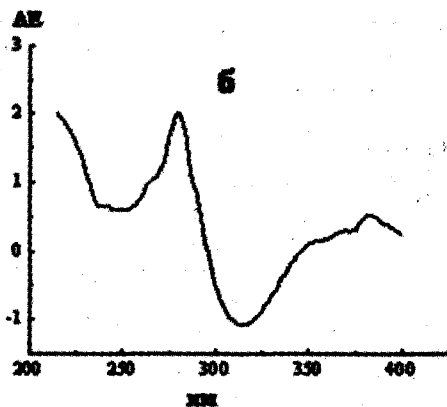
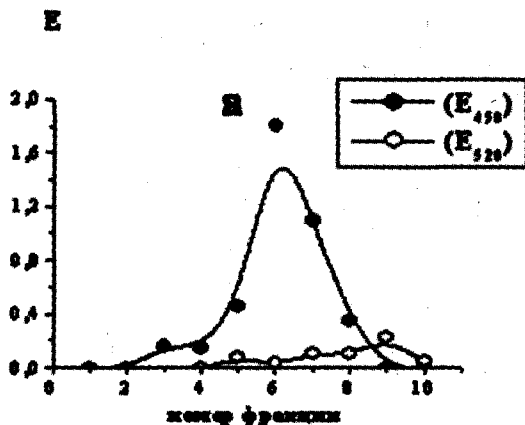
жащая фракция. Затем элюировались 9 фракций (по 3,5 мл): 1 — бесцветная, 2 и 3 — лимонно-желтой окраски, 4 и 5 — интенсивно желтые, 6 и 7 — зеленого цвета (пиовердин) и 8 и 9 — ярко-синего (пиоцианин) (рис.). Для дальнейших исследований нами использованы фракции № 6 — 9.

Известно, что молекулярная масса фосфолипазы С соответствует 76 кДа, а на сефадексе G-25 фракционируют соединения молекулярной массы 1 — 5 кДа, более крупные молекулы выходят в свободном объеме [1, 9]. Молекулярная же масса пиоцианина соответствует 0,21 кДа, а пиовердина — 1,2 кДа [11, 14]. После повторного пропускания фракций № 6 — 9 через колонку сефадекса в элюатах белок не обнаруживался. Прибавление к аликвотам фракций № 6 — 9 10% раствора трихлоруксусной кислоты не приводило к образованию осадка белков, как это наблюдалось во фракции, вышедшей в свободном объеме колонки.

В целях дополнительного исключения возможных следовых примесей белков в образцах пиоцианина этот пигмент выделили также методом экстракции хлороформом, как описано в [12]. Культуру штамма

23/2<sub>Гоб1</sub> выращивали в пептонно-глицериновом бульоне, как рекомендовано в [13] в течение 52 ч, пигментную фракцию отделяли многократной экстракцией хлороформом, затем переводили в водную фазу 0,2 н HCl и записывали спектры абсорбции. При спектроскопии раствор выделенного нами пиоцианина по положению экстремумов спектра абсорбции — 388, 282, 246 нм (рис.) и их амплитудам полностью соответствовал данным литературы для очищенного пиоцианина [15]. Спектр абсорбции пиовердина представлял широкую интенсивную полосу в области 220 — 320 нм, отражающую присутствие пептидного и диоксихинолинового хромоформа, интенсивность которой плавно снижалась к 400 нм с плечом в области 370 нм. Гемолитическая активность 0,15 М очищенного пиоцианина штамма 23/2<sub>Гоб1</sub> по лизису взвеси эритроцитов барана достигала 75,5±1,0%.

Необходимо отметить, что в работах других авторов гемолитическую активность супернатантов определяли всегда в отсутствие пигментов [8, 13]. Ранее мы показали, что 0,6% взвесь бараньих эритроцитов ли-



Профиль элюции пигментных фракций супернатанта культуральной жидкости штамма 23/2<sub>Гоб1</sub> при гель-хроматографии (а) и спектр абсорбции раствора пиоцианина (б).

зировалась в течение 5 мин после внесения в реакционную смесь 0,5 мл супернатанта культуральной жидкости интенсивного сине-зеленого цвета штаммов 23/2<sub>Г061</sub> и 23/2<sub>Г062</sub> [4]. Именно поэтому мы и предположили возможную связь пигментных фракций и гемолиза.

В литературе имелись сведения о способности сине-зеленых пигментов *P. aeruginosa* повреждать эпителиальные и эндотелиальные клетки, угнетать пролиферацию лейкоцитов, ингибировать функции нейтрофилов, лимфоцитов и моноцитов. Сообщалось, что действие очищенного пиоцианина на эритроциты приводит к уменьшению содержания глутатиона, но без гемолиза эритроцитов [5]. Мы зафиксировали наличие способности пиоцианина и пиовердина вызывать гемолиз.

Однако стал вопрос о путях реализации подобной способности соединениями небелковой природы. Как известно, в состав молекулы пиовердина входят диоксихинолиновый хромофор, дикарбоновая кислота и замкнутая пептидная цепь из 6–12 аминокислотных остатков, в составе же пиоцианина аминокислот нет [11].

Ранее было показано, что гемолиз индуцированный белком, лишенным энзиматической активности — стрептолизином O гемолитического стрептококка группы C реализуется при участии активных форм кислорода, а внесение в реакционную смесь перехватчиков активных форм кислорода и комплексонов приводит к подавлению его гемолитической активности [2].

Принимая во внимание это обстоятель-

ство, а также способность пиоцианина генерировать активные формы кислорода — пероксид и супероксид и сидерофорные свойства молекулы пиовердина [5, 11], мы изучили влияние перехватчиков активных форм кислорода и комплексонов на гемолитическую активность пиоцианина и пиовердина, выделенных из супернатантов бульонных культур штаммов 74/5<sub>Г063</sub> и 74/5<sub>Г064</sub>.

Установлено, что в образцах пигментов, полученных после рехроматографии пигментных фракций через сефадекс G-25 с последующим диализом, гемолитическая активность не выявлялась. Добавление перехватчика гидроксильного радикала — формиата натрия, комплексонов типа диэтилдитиокарбамата натрия или ЭДТА также не вело к проявлению таковой активности. Гемолитическая активность у полученных фракций пиоцианина и пиовердина появлялась только в присутствии о-фенантролина (табл. 2), который принято считать достаточно избирательным для ионов железа. В отношении молекулы пиовердина хорошо известна способность связывать эти ионы. Возможно, дополнительная координация таких связанных ионов комплексом способствует проявлению их активности. Что же касается пиоцианина, полученные результаты были неожиданны, поскольку из литературы не известны его свойства взаимодействовать с ионами металлов. Вместе с тем, если на эритроцитарном агаре гемолитическая активность пиоцианина проявлялась только в присутствии о-фенантролина, то эти же образцы пиоцианина вызывали разрушение эритроцитов

Таблица 2. Влияние различных эффекторов ( $10^{-3}$  М) на гемолитическую и лецитиназную активность пигментных фракций

Пигмент	Контроль	Формиат натрия	Диэтилдитиокарбамат натрия	Этилендиаминтетраацетат натрия	о-фенантролин
Гемолитическая активность					
Пиовердин*					
74/5 <sub>Г064</sub>	0	0	0	0	225,7±1,2
74/5 <sub>Г063</sub>	0	0	0	0	253,0±5,3
Пиоцианин**					
74/5 <sub>Г064</sub>	0	0	0	0	218,7±5,3
74/5 <sub>Г063</sub>	0	0	0	0	243,4±1,2
Лецитиназная активность					
Пиовердин*					
74/5 <sub>Г064</sub>	686,0±8,1	836,0±2,0	618,0±18,8	0	0
74/5 <sub>Г063</sub>	538,0±2,0	1268,0±2,0	530,5±30,5	0	0
Пиоцианин**					
74/5 <sub>Г064</sub>	338,0±2,0	453,0±17,0	336,0±0,0	0	0
74/5 <sub>Г063</sub>	536,0±0,0	1268,0±2,0	561,0±0,0	0	0

Примечание. \*Хроматографическая фракция № 6, \*\*фракция, полученная экстракцией хлороформом.

во взвеси без всяких добавок ( $75,5 \pm 1,0\%$ ). Следует отметить, что условия постановки гемолиза в тестах лизиса взвеси эритроцитов и лизиса эритроцитов в тонком слое геля агара несколько различались.

Так, в тесте лизиса взвеси эритроцитов концентрация эритроцитов барана соответствовала 2%, в качестве растворителя использовали 0,05 М фосфатный буфер pH 6,8, содержащий 0,2 М NaCl, в реакционную смесь вносили 0,5 мл исследуемого образца. В тесте же эритроцитарного агара концентрация эритроцитов была 1%, в качестве растворителя использовали 0,15 М раствор NaCl, объем исследуемого образца составлял 0,02 мл. Изложенные обстоятельства диктуют необходимость проведения специальных исследований для выяснения причин расхождения результатов определения гемолитической активности в двух указанных тестах.

Оказалось, что внесение перехватчика супероксидного радикала — нитросинего тетразолия в концентрации  $10^{-3}$  М во взвесь эритроцитов барана полностью подавляла гемолитическую активность пиоцианина (% лизиса эритроцитов): активность контрольного образца (без добавок) —  $74,5 \pm 1,0$ ; активность в присутствии нитротетразолиевого синего — 0. Все это позволяет предположить реализацию гемолитической активности пиовердина и пиоцианина через опосредование активными формами кислорода (супероксидным радикалом) и при участии металлов с переменной валентностью.

Учитывая способность пигментных фракций инициировать гемолиз эритроцитов мы предположили их возможность расщеплять фосфолипиды. Действительно, при нанесении аликвот растворов пигментов на лецитиновый агар были получены зоны лизиса, свидетельствующие о расщеплении лецитина, инициированного пигментами (табл. 2). Этот факт достаточно неожиданен и также не описан в литературе. Он частично отвечает на вопрос о причинах проявления пигментами способности лизировать эритроциты. Однако фосфолипазные свойства пигментов проявлялись в отсутствие о-фенантролина, что существенно отличало их от способности вызывать гемолиз на кровяном агаре. Более того, о-фенантролин полностью подавлял фосфолипазные свойства пигментов. Последние полностью угнетались также ЭДТА, но не диэтилдитиокарбаматом. На расщеп-

ление лецитина в тонком слое агара пигментами микроорганизма не влиял азид натрия, его полностью угнетал нитротетразолиевый синий, а в присутствии формиата натрия — перехватчика гидроксильного радикала расщепление лецитина усиливалось в присутствии пиоцианина на 34 — 137%, а фракцией пиовердина — на 22 — 137% (табл. 2).

Вместе с тем, в отдельных случаях удавалось выделить образцы пиовердина и пиоцианина, обладающие гемолитической активностью и при исследовании лизиса эритроцитов в тонком слое агарового геля. Гемолитическая активность таких образцов полностью подавлялась нитротетразолиевым синим. Так, активность ( $\text{мм}^2$ ) образца пиовердина в контроле —  $136 \pm 2$ , в присутствии тетразолия — 0, активность образца пиоцианина в контроле —  $65 \pm 0,3$ , в присутствии тетразолия — 0. Причина появления собственной гемолитической активности образцов пигментов в одних случаях и отсутствие таковой в других пока остается неясной.

#### ОБСУЖДЕНИЕ

Изложенные результаты позволяют заключить, что пиовердин и пиоцианин патогенных штаммов *P. aeruginosa* способны лизировать эритроциты, а также суспензию очищенного лецитина куриного яйца. Следовательно, указанные пигменты вносят определенный вклад в общую гемолитическую активность патогенных штаммов псевдомонад, которая не зависит всецело лишь от продуцируемой микроорганизмом фосфолипазы С. Этот момент вносит существенное дополнение в патогенетическую роль данных пигментов и в представление об арсенале факторов патогенности псевдомонад. На наш взгляд, он диктует необходимость, учитывая высокую резистентность госпитальных штаммов псевдомонад к широкому спектру антибиотиков и антисептиков включая дезинфектанты, разработки новых методов тактики борьбы с псевдомонадной инфекцией. Это мнение подкрепляется и тем, что изучаемые пигменты наделены не только описанными выше свойствами. Ранее в молекулярных моделях нами установлена заметная ингибирующая активность их на расщепление сывроточного альбумина трипсином,  $\alpha$ -химотрипсином, субтилизином, папаином, металлопротеиназой [3].

То обстоятельство, что литическая активность пигментов блокируется нитротетра-

золиевым синим и чувствительна к отдельным комплексонам, дает основание считать, что таковая опосредована супероксидным радикалом и детерминирована присутствием в молекулах пигментов металлов с переменной валентностью. Этот аспект поднимает ряд частных вопросов, разрешение которых будет способствовать не только углублению представлений о механизме действия пигментов патогенных псевдомонад, но и окажется значимым для идеи неэнзиматического гидролиза биополимеров клетки.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Детерман Г. Гель-хроматография. М., Мир, 1970.
2. Никандров В.Н., Лапушкина Т.Н. Механизм цитолитического действия стрептолизина О: влияние перехватчиков активных форм кислорода и комплексонов на гемолиз эритроцитов. Бюл. exper. биол. мед. 1993, 105 (3): 277-278.
3. Никандров В.Н., Пыжова Н.С., Пыж А.Э. Молекулярные основы патогенности госпитальных штаммов *Pseudomonas aeruginosa*: новые функциональные свойства синие-зеленых пигментов. Совершенствование осуществления государственного санитарного надзора в Республике Беларусь. Минск, 2007.
4. Пыж А.Э., Никандров В.Н. О возможности образования госпитальными штаммами *Pseudomonas aeruginosa* нескольких гемолитических субстанций различной природы. Неидентифицированные гемолизины. В: Тр. Национального НИИ мед. проф. Республики Азербайджан. Баку, 2007, 1, с. 196-202.
5. Пыж А.Э., Никандров В.Н. Синие-зеленые пигменты *Pseudomonas aeruginosa* и их значение в патогенности микроорганизма. Здравоохранение. 2008, 11: 41-45.
6. Пыж А.Э., Никандров В.Н. Влияние меди на рост и образование гемолизина госпитальными штаммами *Pseudomonas aeruginosa*. Новости мед.-биол. наук. 2009, 3: 70-75.
7. Яковлева Е.П., Рожанская Т.И., Левит Ж.Д. и др. Ингибитор фосфолипазы С из *Streptovorticillum muscohepticum*. Прикл. биох. микробиол. 1984, 20: 349-345.
8. Berk R.S. Production and characterization of *Pseudomonas aeruginosa* hemolysin. J. Bacteriol. 1962, 84: 1041-1048.
9. Berka R.M., Vasil M.L. Phospholipase C (heat-labile hemolysin) of *Pseudomonas aeruginosa*: purification and preliminary characterization. Ibid. 1982, 152: 239-245.
10. Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. Anal. Biochem. 1976, 72: 248-254.
11. Cody Y.S., Gross D.C. Characterization of pyoverdins (PSS), the fluorescent siderophore produced by *P. syringae* pv. Appl. Environ. Microbiol. 1987, 53: 928-934.
12. Cox C.D. Role of pyocyanin in the acquisition of iron from transferrin. Infect. Immun. 1986, 52: 263-270.
13. Johnson M.K., Boese-Marrazzo D. Production and properties of heat-stable extracellular hemolysin from *Pseudomonas aeruginosa*. Ibid. 1980, 29: 1028-1033.
14. Mesaros N., Nordmann P., Plesiat P. et al. *Pseudomonas aeruginosa*: resistance and therapeutic options at the turn of the new millennium. Clin. Microbiol. Infect. 2007, 13: 560-578.
15. Watson D., MacDermot J., Wilson R. et al. Purification and structural analysis of pyocyanin and 1-hydroxyphenazine. Eur. J. Biochem. 1986, 159: 309-311.

Поступила 10.08.10

Контактная информация: Пыж Анна Эдуардовна, 220114, Минск, ул. Филимонова, 23, НИИЭМ, р.т. (375)172-64-32-67