

ЗДРАВООХРАНЕНИЕ БЕЛОРУССИИ

7

1982

ТЕОРИЯ И ПРАКТИКА МЕДИЦИНЫ



ОРГАНИЗАЦИЯ ЗДРАВООХРАНЕНИЯ,
ГИГИЕНА И ЭПИДЕМИОЛОГИЯ



ОБМЕН ОПЫТОМ



РАЦИОНАЛИЗАЦИЯ И ИЗОБРЕТАТЕЛЬСТВО

В. Н. НИКАНДРОВ, А. И. КУЗИНА, Т. А. ДЫМОНТ

ОБРАЗОВАНИЕ НЕКОТОРЫХ ЭКЗОТОКСИНОВ β-ГЕМОЛИТИЧЕСКИМИ СРЕПТОКОККАМИ ГРУППЫ С ПРИ РОСТЕ НА ЖИДКИХ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕДАХ

Отдел биохимии (руководитель — кандидат биологических наук В. Н. Никандров)
Белорусского научно-исследовательского института эпидемиологии и микробиологии

Неотъемлемым свойством патогенных стрептококков является образование и выделение во внешнюю среду токсинов (экзотоксинов). Некоторые из них по своей природе являются ферментами и обеспечивают реализацию патогенности микроба. Изучение закономерностей образования экзотоксинов важно по двум причинам. Во-первых, знание их позволит уточнить ряд моментов патогенеза заболеваний, вызываемых стрептококками. Во-вторых, появившаяся возможность использования патогенных микроорганизмов для получения биологически активных веществ и даже лечебных препаратов предусматривает заготовку сырья (культуральной жидкости) с максимальным уровнем желаемого продукта при минимуме сопутствующих экзотоксинов. Из числа последних у гемолитических стрептококков особый интерес представляют стрептокиназа, стрептолизины S и O, неспецифические протеиназы. Вопрос о роли стрептокиназы в патогенности стрептококка дискусионен, а в отношении остальных указанных токсинов доказан бесспорно (Л. В. Белецкая с соавт., 1978; Л. Месробяну с соавт., 1963; М. В. Далин с соавт., 1980). Стрептокиназу в последние годы начали широко использовать в качестве высокоэффективного тромболитического средства (Н. Е. Савченко с соавт., 1979).

В силу перечисленных обстоятельств необходимо тщательное изучение особенностей синтеза токсинов культурами гемолитических стрептококков. Однако данных по этому вопросу в литературе крайне недостаточно.

Материал и методы

Нами изучена динамика биосинтеза стрептокиназы, стрептолизиннов S и O, неспецифических нейтральных протеаз при росте β-гемолитических стрептококков группы С (штаммы H46A и 921) на питательных средах различного состава. В опытах использовали гидролизат казеина (К), гидролизат казеина с мясным или кукурузным экстрактами (К+МЭ или К+КЭ) и бульон Коникова (БК). Среда инокулировали маточной культурой из расчета 200 млн. м.т./мл. Культивирование вели в стеклянных флаконах емкостью 2 литра при $t=37^{\circ}\text{C}$, через каждые 30 минут проводили коррекцию рН в пределах 7,2 с помощью 25 %-ного раствора NaOH. В процессе роста культуры исследовали уровень биомассы (в единицах оптической плотности, Д), внеклеточного белка (мг/мл), активность стрептокиназы (lg фибринолитических единиц), стрептолизиннов (мг гемоглобина/мл), неспецифических протеаз при рН=7,0 (мкМ/тирозина/мл). Определение указанных показателей вели по методам, описанным нами ранее (Н. Л. Шатило с соавт., 1979). Результаты исследований обработаны статистически методом оценки размахов варьирования (И. П. Ашмарин с соавт., 1975).

Результаты

Установлено, что рост обоих штаммов на всех использованных средах заканчивался практически к 14—16 часам (рис. 1), за исключением роста штамма 921 на К+КЭ. В целом, этот

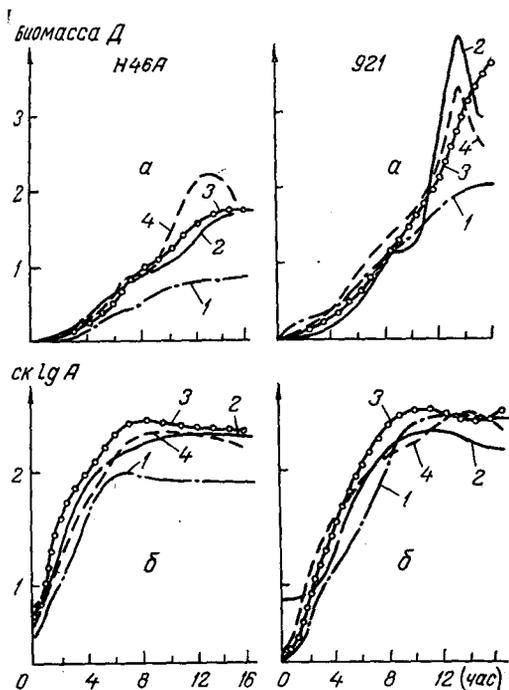


Рис. 1. Динамика биомассы (а) и активности стрептокиназы (б) при культивировании гемолитических стрептококков штаммов Н46А и 921 на гидролизате казеина (1), гидролизате казеина с мясным (2) или кукурузным экстрактами (3), бульоне Коникова (4).

штамм отличался наклонностью к большему урожаю биомассы на всех средах. При добавлении к гидролизату казеина экстрактов или гидролизата мяса отмечена тенденция к усилению роста обоих штаммов по сравнению с таковым только на гидролизате казеина (К).

Кинетика накопления стрептокиназы не была параллельна динамике роста: уровень активности стрептокиназы достигал максимума на 2—6 часов ранее, чем заканчивался рост культуры. Мы не выявили принципиальной разницы между штаммами по максимально возможному уровню стрептокиназы, но при росте на К штамм 921 к 12 часам образовывал фермента больше, чем штамм Н46А ($P < 0,05$). Максимальный уровень стрептокиназы при росте штамма 921 достигался позднее, обогащение среды экстрактами в меньшей степени изменяло уровень стрептокиназы, чем в случае штамма Н46А.

Обогащение экстрактами питательной среды или переход на БК резко сдвигают во времени максимум накопления стрептолизина S при росте штамма Н46А (рис. 2). Изменения максимума синтеза указанного токсина во времени при обогащении среды в случае штамма 921 были менее значительны (за исключением роста на К+МЭ). Однако колебания уровня стрептолизина S при росте штамма на разных средах более демонстративны ($P < 0,05$), и лишь обогащение К кукурузным экстрактом сравнительно мало отразилось на синтезе токсина.

Уровень стрептолизина О при росте штамма Н46А на разных питательных средах различался мало. Динамика синтеза носила сложный многофазный характер и претерпевала существенные изменения. При росте штамма 921 отмечалась тенденция к снижению уровня токси-

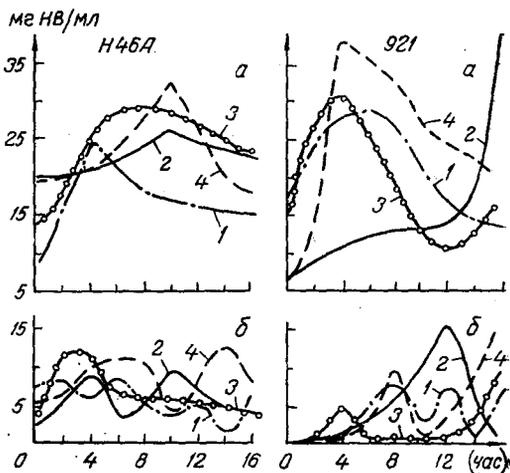


Рис. 2. Накопление стрептолизинов S (а) и О (б) в процессе роста стрептококков штаммов Н46А и 921 на различных питательных средах (обозначения те же, что на рис. 1).

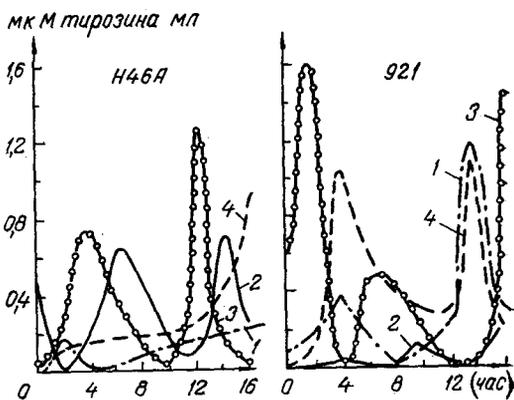


Рис. 3. Биосинтез неспецифических нейтральных протеаз стрептококками при росте на питательных средах разного состава.

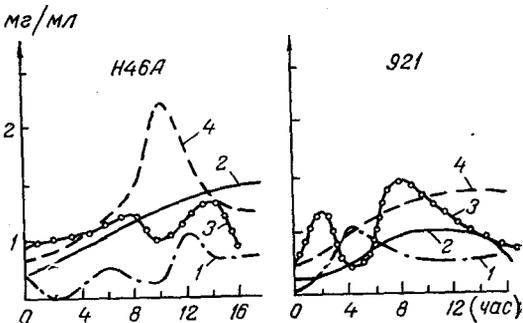


Рис. 4. Изменения уровня внеклеточного белка в процессе роста гемолитических стрептококков на жидких питательных средах.

на в случае использования К+КЭ и тенденция к повышению — при использовании К+МЭ. В последнем случае многофазность отсутствовала.

Штамм 921, в целом несколько более активен, как продуцент протеаз в сравнении со штаммом Н46А (рис. 3). При росте обоих штаммов самый высокий уровень фермента най-

ден на К+КЭ, а наименьший — при росте штамма Н46А на К ($P < 0,05$). Практически во всех случаях синтез протеаз носит двуфазный характер, то есть наблюдаются 2 пика активности в динамике роста. Обогащение К экстрактами или переход на БК стимулируют синтез фермента ($P < 0,05$), за исключением роста штамма 921 на К+МЭ.

Сопоставление динамики накопления протеаз с характером изменений уровня внеклеточного белка (рис. 4) позволяет выявить чрезвычайно разнообразные сдвиги при росте штаммов на разных питательных средах. В одних случаях уровень белка и активность протеаз изменяются однонаправленно, в других отмечаются сдвиги противоположной направленности, а в третьих закономерность вообще трудно установить.

Очевидно, в различных условиях разные штаммы то используют белки питательной среды, то, наоборот, синтез внеклеточного белка превалирует над использованием протеинов питательной среды.

Судя по изменениям показателей, штамм 921 имеет более пластичный обмен, поскольку отвечает на обогащение среды более разнообразными сдвигами, чем штамм Н46А, для которого характерны однотипно направленные изменения уровня токсинов.

Обсуждение

Полученные материалы, во-первых, дают косвенное подтверждение тому, что стрептокиназа — внеклеточный белок или, по крайней мере, внутри клеток нет ее активных молекул. Такое заключение позволяет установить отсутствие прироста активности стрептокиназы при наличии процесса аутолиза микробных тел в конце культивирования. Об аутолизе свидетельствует уменьшение в ряде случаев уровня биомассы (рис. 1). Не удается обнаружить какой-либо взаимосвязи в динамике синтеза стрептокиназы, стрептолизина S и O, неспецифических протеаз. Однако динамика синтеза стрептолизина S и O в ряде случаев имеет противоположный характер, что наводит на мысль о существовании каких-то своеобразных отношений между этими гемолизинами.

Динамика накопления стрептолизина O и протеаз очень сложна. Ранее мы (Н. Л. Шатило с соавт., 1979) проанализировали возможные причины этого явления в отношении протеаз у двух клонов штамма 921: клон 13 и клон М-I, которые были выделены в результате направленного отбора. В том случае мы исходили из представлений о возможности синтеза стрептококком ингибитора протеолитических ферментов и разных соотношений протеаза-ингибитор в процессе роста. Однако в динамике роста указанных клонов не наблюдалось столь явного аутолиза культуры. В этом случае колебательный характер накопления токсинов (протеазы, гемолизина) и уровня белка может быть обусловлен именно аутолитическим распадом клеток, наступающим к 14-му часу.

Заключение

Все изложенное позволяет сделать заключение о необходимости жесткой стандартизации и соблюдении режимов биосинтеза при получении биологически активных препаратов из стрептококков, поскольку даже небольшие отклонения во времени очень резко меняют характеристики сырья. Кроме того, полученные данные дают возможность судить, насколько пестра и разнообразна может быть картина интоксикации в каждом конкретном случае инфицирования и развития болезни. Это диктует необходимость тщательного анализа картины интоксикации, установления ее составляющих для разработки эффективных мер борьбы с интоксикацией описываемыми компонентами.

ЛИТЕРАТУРА

Ашмарин И. П., Васильев Н. Н., Амбросов В. А. Быстрые методы статистической обработки и планирование экспериментов.— Л., 1975. ÷ Белецкая Л. В., Верболович П. А., Полосухина Т. Я. Экспериментальная стрептококковая инфекция (основные итоги и перспективы исследования).— Алма-Ата, 1978. ÷ Далин М. В., Фиш Н. Г. Белковые токсины микробов.— М., 1980. ÷ Месробиану Л., Пэунеску Э. Физиология бактерий.— Бухарест, 1963. ÷ Савченко Н. Е., Вотяков В. И., Никандров В. Н.— В кн.: Стрептокиназа и другие тромболитические ферменты. Минск, 1979, с. 3. ÷ Шатило Н. Л., Никандров В. Н., Кузина А. И. и др.— В кн.: Стрептокиназа и другие тромболитические ферменты. Минск, 1979, с. 58.

Поступила 07.05.81.

FORMATION OF SOME EXOTOXINS BY β -HEMOLYTIC STREPTOCOCCI OF C-GROUP DURING GROWTH ON LIQUID CULTURE MEDIUMS

V. N. Nikandrov, A. I. Kuzina, T. A. Dymont

Peculiarities of biosynthesis of streptokinase, S and O streptolysins, aspecific neutral proteinases have been demonstrated in the dynamics of growth of β -hemolytic Н46А and 921 streptococci on media of different composition. The authors infer both the necessity of standardization of a biosynthesis rate in the application of streptococci for biotechnology purposes and a possible variety of intoxication picture in streptococcosis.