УДК 579

АНТИЛИЗОЦИМНАЯ, АНТИИНТЕРФЕРОНОВАЯ И АНТИКОМПЛЕМЕНТАРНАЯ АКТИВНОСТЬ НЕКОТОРЫХ БАКТЕРИЙ СЕМЕЙСТВА *ENTEROBACTERIACEAE*

Гайрабеков Р.Х.[1], Гайрабекова Р.Х.[1], Губханова С.А.[1], Турлова Ф.С.[1], Умиева З.Э.[1]

[1] *ФГБОУ ВО «Чеченский государственный университет», Грозный, e-mail: ruslan.sarmat@mail.ru*

Возрастание значимости условно-патогенных микроорганизмов в патологии человека и животных отмечается в последнее время специалистами медицинской и ветеринарной службы. Одной из целого ряда причин, находящихся в основе этого роста, является слабая изученность биологии этих микроорганизмов, путей их распространения и циркуляции. В работе исследованы на наличие антилизоцимной, антиинтерфероновой и антикомплементарной активности 190 культур Eschrtichia coli, 124 культуры Enterobacter cloacae, 29 культур Serratia marcescens, 74 культуры Morganella morganii, 51 культура Citrobacter freundii, выделенных от мелкого рогатого скота на территории Чеченской Республики. Исследования показали, что способность к инактивации факторов естественной противоинфекционной резистентности макроорганизма, в частности антилизоцимная, антикомплементарная и антиинтерфероновая активности, довольно широко представлены у всех исследованных штаммов бактерий.

Ключевые слова: антилизоцимная активность, антиинтерфероновая активность, антикомплементарная активность, лизоцим, интерферон, комплемент, *Escherichia*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Morganella*, *Citrobakter.*

ANTILYSOZYMIC, ANTIINTERFERON AND ANTICOMPLEMENTARY ACTIVITY OF SOME BACTERIA OF THE *ENTEROBACTERIACEAE* FAMILY

Gayrabecov R.Ch.[1], Gayrabecova R.Ch.[1], Gubchanova S.A.[1], Turlova F.S.[1], Umieva Z.A.[1]

[1]*Chechen state university, Grozny, e-mail: ruslan.sarmat@mail.ru*

The increase in the significance of opportunistic pathogens in human and animal pathology noted in recent medical and veterinary service personnel. One of a number of reasons which are at the heart of this growth is poorly understood biology of these microorganisms, the ways of their dissemination and circulation. The paper examined for the presence of antilysozyme, antiinterferon and anticomplementary activity of 190 cultures *Eschrtichia coli*, 124 cultures *Enterobacter cloacae*, 29 cultures *Serratia marcescens*, 74 cultures *Morganella morganii*, 51 cultures of *Citrobacter freundii*, isolated from sheep and goats on the territory of the Chechen Republic. Studies have shown that the ability to inactivate factors of natural resistance of anti-microorganism, in particular antilysozyme, and antiinterferon anticomplementary activity is widely represented in all studied strains of bacteria.

Keywords: antilysozyme activity antiinterferonovaya activity, anticomplementary activity, lysozyme, interferon, complement, *Escherichia*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Morganella*, *Citrobakter.*

Способность бактерий преодолевать защиту организма хозяина от инфекционных агентов характеризует адаптационные возможности микробных клеток и обеспечивает их персистенцию, т.е. выживание во враждебной среде макроорганизма [9]. Длительное переживание бактерий в организме хозяина, носящее название персистенция (от лат. persistere – оставаться, упорствовать), вероятно, следует рассматривать как форму симбиоза микробов и организма человека. Анализ имеющихся фактических материалов по выживанию микроорганизмов в хозяине убеждает, что в процессе взаимодействия обоих участников инфекции у возбудителя эволюционно закрепились четыре способа защиты (изоляции) пептидогликана от факторов иммунитета: 1) экранирование клеточной стенки бактерий; 2) продукция секретируемых факторов, инактивирующих защиту хозяина; 3) образование форм

с отсутствием (дефектом) клеточной стенки бактерий (L-формы, микоплазмы); 4) антигенная мимикрия.

Наиболее «прорывной» областью исследований является выявление у бактерий новых факторов инактивации соответствующих защитных субстратов хозяина. В основном это секретируемые протеазы, обеспечивающие микроорганизмам выживание в экосистеме «человек – бактерии».

Лизоцим или N-ацетилмурамидаза является ферментом, разрывающим 1-4 β-гликозидную связь между N-ацетилгюкозамином и N-ацетилмураминовой кислотой в молекуле пептидогликана клеточной стенки бактерий, в результате чего происходит лизис бактерий.

Роль лизоцима в защите макроорганизма от инфекции общеизвестна. Антилизоцимная активность является одним из факторов, повышающих толерантность бактерий к действию сывороточного лизоцима человека и животных. Способность патогенных и условно-патогенных бактерий к длительному выживанию в организме хозяина называется персистенция.

Некоторые авторы полагают [3], что антилизоцимная активность способствует длительной выживаемости бактерий в макроорганизме и может быть использована в условиях баклабораторий для оценки этиологической роли выделенных культур. Свойство бактерий специфически инактивировать лизоцим хозяина, которое определяется как антилизоцимная активность, широко встречается у бактерий, относящихся к семейству *Enterobacteriaceae* у стафилококков и др.

Обнаружение у бактерий антилизоцимной активности, специфически инактивирующей лизоцим хозяина, выявило широкую частоту встречаемости этого признака.

«Антиинтерфероновая» активность бактерий выявлена у большой группы грамотрицательных и грамположительных микроорганизмов. Штаммы энтеробактерий, выделенные от больных лиц, обладали данным признаком в 90,4-100% случаев, тогда как среди штаммов, изолированных от здоровых лиц и из внешней среды, этот показатель соответственн6о был снижен до 16,1-1,6%. Антиинтерфероновый признак – автономное свойство микроорганизмов, предназначенное для целенаправленного, специфического инактивирования бактерицидной фракции человеческого лейкоцитарного интерферона [6].

Ю.А. Брудастов (1992), изучавший антикомплементарную активность бактерий, выявил наличие этого признака у стафилококков, кишечных палочек и клебсиелл [2]. Комплемент, как естественный фактор резистентности организма, обеспечивает выраженность проявления защитных сил против патогенных и потенциально-патогенных микроорганизмов. Но он может подвергаться бактериальной деградации, и, таким образом,

антикомплементарная активность бактерий способствует их длительному персистированию в организме [4; 5; 7-9].

Для выявления факторов, способствующих сохранению жизнеспособности бактерий в организме, проводили изучение свойств персистенции: антилизоцимную, антикомплементарную и антиинтерфероновую активность бактерий родов *Escherichia, Enterobacter, Morganella, Citrobacter, Serratia*.

Исследования показали, что способность к инактивации факторов естественной противоинфекционной резистентности макроорганизма, в частности антилизоцимная, антикомплементарная и антиинтерфероновая активности, довольно широко представлены у всех исследованных штаммов бактерий, выделенных от мелкого рогатого скота в Чеченской Республике.

Материал и методы

В работе исследованы на наличие антилизоцимной, антикомплементарной и антиинтерфероновой активности 190 культур *Eschrtichia coli*, 124 культуры *Enterobacter cloacae*, 74 культуры *Morganella morganii*, 29 культур *Serratia marcescens*, 51 культура *Citrobacter freundii*, выделенные от овец на территории Чеченской Республики [1; 10-16].

Изучение антилизоцимной активности проводили по методу О.В. Бухарина (1984) [3]. Для определения антилизоцимной активности на физиологическом растворе готовили ряд разведений лизоцима из яичного белка (Олайнский завод химреактивов) в концентрациях (2, 3, 4, 5, 10, 20, 30, 40, 50 мкг/мл). 0,5 мл каждого разведения лизоцима смешивали с 4,5 мг расплавленного и остуженного до 45 ºС 1,5%-ного питательного агара и выливали в чашки Петри. На агар с лизоцимом наносили стандартной петлей капли суточных культур исследуемых штаммов. Посевы инкубировали 18-24 ч. при 37 °С, затем исследуемые культуры, выросшие в макроколониях, убивали парами хлороформа в течение 10 минут.

После этого макроколонии заливали вторым слоем 3 мл 0,7%-ной агаровой питательной среды, смешанной с 0,1 мл бактериальной взвеси суточной агаровой индикаторной культуры Micrococcus luteus (АТСС № 29470, ГНИИСК им. Л.А. Тарасевича), с мутностью 4 по Мак Фарланду, и ставили в термостат при 37 °С на сутки.

Тест считался положительным при росте индикаторного штамма *Micrococcus luteus* вокруг колоний тех штаммов, которые нейтрализовали внесенный в слой агара яичный лизоцим.

Антиинтерфероновую активность у выделенных культур исследовали по методу О.В. Бухарина и В.Ю. Соколова (1990) [6] с учетом антибактериального действия препарата человеческого лейкоцитарного интерферона. При определении антиинтерфероновой активности исследуемые культуры выращивали в среде, содержащей препарат человеческого

лейкоцитарного интерферона в различных разведениях (1, 2, 5, 10 ед.). Выросшие культуры убивали хлороформом в течение 10 минут, на посев наслаивали 0,7%-ный агар, содержащий взвесь тест-культур Corynebacterium xerosis (АТСС № 181, ГНИИСК им. Л.А. Тарасевича). Чашки инкубировали 24 часа при 37 °С и определяли антиинтерфероновую активность микроорганизмов по наличию роста тест-культуры вокруг колоний исследуемых штаммов.

При этом антиинтерфероновую активность исследуемого штамма считали высокой при инактивации человечского лейкоцитарного интерферона в концентрации более 2 ед., средней – от 1,1 – 2 ед. и низкой – от 0 до 1 ед.

Изучение антикомплементарной активности (АКА) проводили по методу О.В. Бухарина и соавторов [4; 7]. Исследуемые культуры энтеробактерий выращивали в течение 18-24 часов при 37 °С на слое 1,5%-ного питательного агара, после чего инактивировали в течение 10 минут в парах хлороформа. Затем наслаивали второй слой 0,7%-ного агара, содержащего комплемент в концентрациях 1, 5, 10, 20 СН50/мл (в качестве источника комплемента использовали сыворотки от 20-25 доноров). Данная двухслойная система инкубировалась 1 час при 37 °С для осуществления инактивации комплемента вокруг колоний стафилококков и клебсиелл, обладающих указанным признаком. Далее наслаивали третий слой - 0,7%-ного питательного агара, содержащего 0,1 мл бактериальной взвеси индикаторной культуры E.coli, с мутностью 2 по Мак Фарланду (АТСС № 25922, ГНИИСК им. Л.А.Тарасевича) в 0,15 М растворе хлорида натрия.

После 16-18-часовой инкубации при 37 °С, во время которой происходит выявление антикомплементарных свойств, проводили регистрацию результатов по росту индикаторного штамма вокруг исследуемых культур, где произошла инактивация комплемента. При этом штаммы считали высокоактивными при инактивации комплемента в концентрации >15,1 СН50/мл и более, среднеактивными – от 5 до 15 СН50/мл, низкоактивными – от <0 до 5 СН50/мл.

Результаты исследований

Проведенные нами исследования (таблица 1) показали, что антилизоцимная активность характерна для большинства исследованных культур энтеробактерий. Наибольшее количество штаммов, обладающих этим признаком, выявлены среди 29 исследованных культур *Serratia marcescens* – 86,2%, среди 51 культуры *Citrobacter freundii* антилизоцимноактивных было 60,8%, среди 74 культур *Morganella morganii* – 59,5%, среди 190 культур *Eschrtichia coli* – 52,6%, и среди 124 культур *Enterobacter cloacae* таких штаммов было наименьшее количество – 43,5%.

Таблица 1

Антилизоцимная активность у представителей разных родов семейства *Enterobacteriaceae*

Вид микроорганизма	Число исследованных штаммов	Число штаммов с антилизоцимной активностью	Процент штаммов с антилизоцимной активностью (X±m)
Serratia marcescens	29	25	86,2±7,7
Citrobacter freundii	51	31	60,8±10,4
Morganella morganii	74	44	59,5±9,3
Eschrtichia coli	190	100	52,6±11,4
Enterobacter cloacae	124	54	43,6±1,8

Антиинтерфероновая активность у исследованных микроорганизмов разных родов проявлялась реже по сравнению с другими факторами персистенции (таблица 2). Наиболее часто этот признак проявлялся у представителей рода *Escherichia* - 104 штамма из 190 исследованных культур (54,7%), у *Citrobacter* – 24 штамма из 51 культуры (47,1%), у *Enterobacter* – 54 штамма из 124 культур (43,6%), у *Serratia* – 9 штаммов из 29 культур (31,03%), и наименее характерным этот признак был для представителей рода *Morganella* – 21 штамм из 74 культур (28,4%).

Таблица 2

Антиинтерфероновая активность у представителей разных родов семейства *Enterobacteriaceae*

Вид микроорганизма	Число исследованных штаммов	Число штаммов с антиинтерфероновой активностью	Процент штаммов с антиинтерфероновой активностью (X±m)
Eschrtichia coli	190	104	54,7±4,3
Citrobacter freundii	51	24	47,1±5,2
Enterobacter cloacae	124	54	43,6±1,5
Serratia marcescens	29	9	31,03±3,7
Morganella morganii	74	21	28,4±1,2

Антикомплементарная активность - широко распространенное свойство среди исследованных культур микроорганизмов (таблица 3). Так, среди представителей рода *Escherichia* с антикомплементарной активностью было 178 культур из 190 исследованных (93,7%), среди *Enterobacter* – 59 культур из 124 (47,6%), среди *Serratia* – 26 культур из 29 (89,7%), среди *Morganella* – 58 культур из 74 (78,4%), среди *Citrobacter* – 48 культур из 51 (94,1%).

Таблица 3

Антикомплементарная активность у представителей разных родов семейства *Enterobacteriaceae*

Вид микроорганизма	Число	Число штаммов с	Процент штаммов с

	исследованных штаммов	антикомплементарной активностью	антикомплементарной активностью (X±m)
Citrobacter freundii	51	48	94,1±1,6
Eschrtichia coli	190	178	93,7±7,4
Serratia marcescens	29	26	89,7±1,8
Morganella morganii	74	58	78,4±5,4
Enterobacter cloacae	124	59	47,6±2,7

Заключение

Приведенные в статье данные свидетельствуют о том, что антилизоцимная, антиинтерфероновая и антикомплементарная активности - широко распространенные свойства среди исследованных культур энтеробактерий. Среди этих культур антикомплементарная активность - наиболее распространенное свойство по сравнению с антилизоцимной и антиинтерфероновой активностью, его встречаемость колеблется от 47,6% у штаммов *Enterobacter cloacae* до 94,1% у культур *Citrobacter freundii.* Антилизоцимная активность отмечается минимально среди культур *Enterobacter cloacae* – 43,6% штаммов и максимально среди культур *Serratia marcescens* – 86,2% штаммов. Антиинтерфероновая активность встречается сравнительно реже у исследованных культур, встречаемость этого свойства у них колеблется от минимального количества штаммов среди *Morganella morganii* – 28,4% и до максимального – 54,7% штаммов среди *Eschrtichia coli.*

Список литературы

1. Ачаев Р.А. Адгезивная способность некоторых условно-патогенных энтеробактерий, выделенных от овец при ассоциативных гельминтозно-бактериальных заболеваниях / Р.А. Ачаев, Р.Х. Гайрабеков, Ф.С. Турлова, З.Э. Умиева // Естественные науки. АГУ. – 2011. – № 2. – С. 113-117.
2. Брудастов Ю.А. Антикомплементарная активность бактерий : автореф. канд. дис. - Челябинск, 1992.
3. Бухарин О.Б., Васильев Н.В. Лизоцим и его роль в биологии и медицине. – Томск : Изд-во Томского университета, 1974. – 208 с.
4. Брудастов Ю.А., Валышев А.В., Брудастов А.Н. Антикомплементарная активность // Журнал микробиологии. – 1996. – № 3. – С. 91-93.
5. Бухарин О.В. Биомедицинские аспекты персистенции бактерий // Журнал микробиологии. – 1994. – № 4. – Приложение. – С. 4-13.

6. Бухарин О.В., Соколов В.Ю. Способ определения антиинтерфероновой активности микроорганизмов : А.с. 1564191 СССР № 18. – 1990.

7. Бухарин О.В., Брудастов Ю.А., Дерябин Д.Г. Изучение антикомплементарной активности стафилококков // Ж. клин. лаб. диагн. – 1992. – № 3. – С. 43-46.

8. Бухарин О.В., Брудастов Ю.А., Валышев А.В., Брудастов А.Н. Антикомплементарная активность производственного штамма Bacillus cereusIP 5832 и энтеробактерий при их совместном культивировании // Журн. микробиол. – 1996. – № 3. – С. 91-93.

9. Бухарин О.В. Персистенция бактериальных патогенов как физиологический феномен // Вестник московского университета. Сер. 16. Биология. - 2008. – № 1. – С. 6-13.

10. Гайрабеков Р.Х. Некоторые свойства культур Serratia, выделенных от овец при постгельминтозных дисбактериозах // Материалы XI Международной науч. конф. «Биологическое разнообразие Кавказа». – Магас, 2009. – С. 233-234.

11. Гайрабеков Р.Х. Некоторые свойства культур Escherichia coli, выделенных от овец при ассоциативных гельминтозно-бактериальных заболеваниях / Р.Х. Гайрабеков, Э.С. Эржапова, Ф.С. Турлова, З.Э. Умиева // Юг России: экология, развитие. – 2010. – № 4. – С. 83-86.

12. Гайрабеков Р.Х. Некоторые факторы патогенности культур Enterobacter cloacae, выделенных от овец при ассоциативных гельминтозно-бактериальных заболеваниях / Р.Х. Гайрабеков, Р.А. Ачаев, Э.С. Эржапова, Р.С. Эржапова // Юг России: экология, развитие. – 2010. – № 3. – С. 100-102.

13. Гайрабеков Р.Х. Биологические свойства Serratia marcescens, выделенных от овец и объектов окружающей среды на территории Чеченской Республики / Р.Х. Гайрабеков, Ф.Р. Гайрабекова // Естественные и технические науки. – 2010. – № 2. – С. 147-149.

14. Гайрабеков Р.Х. Некоторые факторы патогенности бактерий рода Serratia / Р.Х. Гайрабеков, Ф.С. Турлова // Естественные и технические науки. – 2011. – № 4. – С. 163-169.

15. Гайрабеков Р.Х. Гемолитическая активность энтеробактерий, выделенных от овец, инвазированных гельминтами / Р.Х. Гайрабеков, Ф.С. Турлова, З.Э. Умиева, Л.А. Алтамирова, Р.А. Ачаев // Естественные и технические науки. – 2011. – № 4. – С. 170-172.

16. Гайрабеков Р.Х. Персистирующая способность некоторых условно-патогенных энтеробактерий, выделенных от овец при ассоциативных гельминтозно-бактериальных заболеваниях // Естественные науки. АГУ. – 2010. – № 4. – С. 148-151.