

УДК 579.22

Н. В. Кур'ята, асп., **Н. О. Єлинська**, канд. біол. наук, доц.
Одеський національний університет, кафедра мікробіології і вірусології,
вул. Дворянська, 2, Одеса, 65026, Україна

ЗДАТНІСТЬ ШТАМІВ ЛАКТОБАЦИЛ ПРОДУКУВАТИ АНТИДЕФЕНСИНІ

Досліджували здатність штамів лактобацил, виділених з травного тракту дітей, та колекційних штамів до продукції антидефенсинів. Встановлено, що жоден штам лактобацил не був здатен інактивувати лізоцим. У 11,8 % штамів лактобацил, які зберігалися протягом 6 місяців, виявлено антикомплементарну активність (АКА), встановлено її рівень. Показано, що при зберіганні упродовж 18 місяців усі штами лактобацил втрачали АКА.

Ключові слова: лактобацили, антидефенсини, лізоцим, комплемент.

Одну з важливих ролей в утриманні бактерій всередині макроорганізму вчені відводять секретії антидефенсинів – чинників бактеріальної природи, що інактивують захисні механізми хазяїна, до яких в першу чергу відносяться лізоцим та комплемент [1, 2].

Здатність бактерій специфічно інактивувати лізоцим хазяїна було визначено як антилізоцимну активність, роль якої полягає в персистенції мікроорганізмів, однак в літературі наявні дані лише про патогенні мікроорганізми [2]. Ця ознака зустрічається у більшості видів (88 – 100 % випадків) грамнегативних патогенних бактерій. Для грампозитивних патогенних бактерій ця ознака не є характерною і зустрічається лише у 4,2 % штамів [3]. Один із варіантів механізму антилізоцимної активності представників індигенної кишкової мікробіоти автори вбачають в утилізації бактеріями лізоциму як ростового субстрату, оскільки для бактерій він може бути важливим джерелом органічного азоту.

Антилізоцимна активність повинна розглядатися не лише як механізм персистенції того чи іншого мікроорганізму всередині хазяїна, а і як можливий імунодепресивний чинник. Адже лізоцим є одним з важливих чинників імунітету і входить до низки провідних бактерицидних ферментних систем клітин фагоцитарного ряду, а також інших клітин і тканин організму [3].

До секретованих чинників, які забезпечують персистування мікробної клітини, слід віднести і здатність до інактивації антибактеріального фрагменту препарату людського лейкоцитарного інтерферону. Бактеріальній деградації підлягає і комплемент. Антикомплементарна активність відома для стафілококів, стрептококів, нейсерій та псевдомонад [4]. Про можливу антикомплементарну активність лактобацил дані літератури відсутні.

Як видно з літератури, антилізоцимна і антикомплементарна активність досліджувалася майже виключно для патогенних мікроорганізмів, у той

час коли є всі підстави вважати, що вона може бути властивою і представником нормальної мікробіоти організму людини, зокрема – лактобацилам.

Метою даної роботи було дослідження здатності штамів лактобацил до продукції антидефенсинів, здатних інактивувати лізоцим і комплемент.

Матеріал і методи дослідження

Матеріалом дослідження слугували 64 штами лактобацил, ізольованих із кишечника здорових дітей, та музейні штами: *L. buchneri* ATCC 4005, *L. fermentum* ATCC 14931, *L. acidophilus* ATCC 33200, *L. helveticus* ATCC 15009, *L. gasseri* AO 11 і *L. acidophilus* ATCC 4356.

Антилізоцимну активність цих штамів визначали за допомогою якісного фотометричного методу Hawiger [5] у нашій модифікації. Досліджувані штами лактобацил вирощували у 5 мл рідкого живильного середовища MRS при 37 °С протягом 24 годин і центрифугували за 3000 об/хв протягом 30 хвилин. Чисту культуру тест-штаму на лізоцим *Micrococcus luteus* УКМ Ас 645^Т вирощували на м'ясо-пептонному бульйоні при 37 °С протягом 48 годин, центрифугували за 3000 об/хв протягом 30 хвилин. Супернатант зливали, фрагменти клітинних стінок отримували, приливаючи до осаду клітин 0,5 % розчин NaCl [6]. Отриману суміш центрифугували та двічі відмивали 1/15 М фосфатним буфером (KH_2PO_4 – 7,72 г, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ – 1,78 г, води дистильованої – до 1000 мл; рН 7,2 – 7,4), після чого її екстинкцію доводили до 0,300 на спектрофотометрі СФ-26 при $\lambda=540$ нм [7]. Суспензію клітинних стінок автоклаували при 120 °С протягом 20 хвилин і зберігали при 4 °С [8].

В дослідні пробірки вносили по 1 мл супернатантів досліджуваних штамів лактобацил і розчину стандартного яєчного лізоциму в концентрації 30 мкг/мл. Контролем слугувала суміш 1 мл розчину лізоциму в концентрації 30 мкг/мл та 1 мл стерильного MRS-бульйону. Суміш інкубували протягом 2 годин при 37 °С, після чого туди додавали по 2 мл стандартної суспензії фрагментів клітинних стінок тест-мікроба *Micrococcus luteus* УКМ Ас 645^Т. Штам вважали здатним до інактивації лізоциму, якщо у якісному тесті на продукцію антилізоцимних агентів дослідне значення екстинкції було вищим від контрольного на 10 %, тобто якщо виконувалася умова $E_d/E_k - 1 \geq E_k/10$, де E_k – контрольне значення екстинкції, а E_d – дослідне.

Для вивчення здатності штамів лактобацил інактивувати комплемент використовували фотометричний метод. Досліджувані штами лактобацил вирощували у 5 мл рідкого живильного середовища MRS при 37 °С протягом 24 годин і тричі відмивали фосфатним буфером рН 7,2 – 7,4, після чого об'єм суспензій доводили тим же буфером до початкового. У якості джерела комплементу використовували сироватку морської свинки. Активність комплементу визначали перед основним дослідом за допомогою фотометричного методу [9]. У дослідних пробірках об'єднували по 1 мл суспензії лактобацил і комплементу, концентрація якого в фізіологічному розчині становила 20 С¹H₅₀. Контролем слугували пробірки, куди замість

суспензій лактобацил додавали буферний розчин. Пробірки інкубували при 37 °С протягом 2 годин. Потім туди додавали по 2 мл 5 % суспензії еритроцитів барана в фосфатному буфері рН 7,2 – 7,4, сенсibiliзованих гемолітичною сироваткою, після чого суміш інкубували при 37 °С протягом 1 години. Реакцію зупиняли, витримуючи пробірки 10 хвилин у холодильнику при температурі 4 °С. Проби центрифугували при 2000 об/хв протягом 5 хвилин і вимірювали їх екстинкцію при $\lambda = 480$ нм. Антикомплементарну активність (АКА) лактобацил визначали за формулою $(1 - E_k/E_d) \cdot C/E_s$, де E_k і E_d – контрольне і дослідне значення екстинкції (одиниць), C – початкова концентрація комплементу (C^1H_{50} -одиниць), E_s – екстинкція суспензій лактобацил у ростових концентраціях. АКА виражали в анти- C^1H_{50} /од. екстинкції суспензії лактобацил. Наявність антикомплементарної властивості бактерій перевіряли через 6 і 18 місяців після виділення штамів лактобацил з природного середовища.

Результати і їх обговорення

За допомогою якісного тесту на наявність антилізоцимної активності (АЛА) нами було встановлено, що жоден штам лактобацил не був здатним до інактивації стандартного яечного лізоциму.

Якісні дослідження на наявність антикомплементарної активності (АКА) показали, що через 6 місяців після виділення з природного середовища 11,8 % досліджуваних штамів лактобацил були здатними до інактивації комплементу в гемолітичній системі. Більшість штамів лактобацил не мали АКА.

Дані про рівень АКА штамів лактобацил, здатних до інактивації комплементу в гемолітичній системі через 6 місяців після виділення, наведено в табл. 1. Як видно з таблиці 1, серед штамів, здатних до інактивації комплементу, найбільшу АКА виявив штам *L. helveticus* ATCC 15009. Рівень його АКА становив $22,15 \pm 0,67$ анти- C^1H_{50} . АКА 2-х досліджуваних штамів лактобацил (2,9 % від загальної кількості досліджуваних штамів) було оцінено як низьку (рівень її становив $4,69 \pm 0,15$ і $4,76 \pm 0,18$ анти- C^1H_{50}), 5-ти штамів (7,4 %) – як середню (від $5,37 \pm 0,02$ до $5,92 \pm 0,03$ анти- C^1H_{50}).

Дослідження наявності АКА штамів лактобацил, проведені через 18 місяців після їх виділення з природного середовища, показали, що за умов довгострокового зберігання на середовищі MRS усі штами лактобацил втратили здатність інактивувати комплемент в гемолітичній системі (рис. 1).

Як видно з наведених результатів, клітини штамів лактобацил мали здатність знижувати активність комплементу в гемолітичній системі. Однак частка штамів, здатних до інактивації комплементу через 6 місяців після виділення з природного середовища, була незначною (11,6 %), і більшість із них демонстрували низький та середній рівень АКА. Через 18 місяців після виділення з природного середовища у всіх штамів лактобацил спостерігалася повна втрата антикомплементарних властивостей. Схо-

жий ефект описано в літературі для виробничого штаму *Bacillus cereus* IP 5832, який протягом адаптації до ростового середовища поступово знижував АКА, і згодом її зовсім втратив [1]. Отримані нами дані свідчать про індукцибельну природу антикомплементарної ознаки у лактобацил, яка в лабораторних умовах втрачається.

Таблиця 1

Антикомплементарна активність штамів лактобацил

Ступінь АКА	Штам	Рівень АКА, анти-С ¹ Н ₅₀
Низький	<i>Lactobacillus sp.</i> 17	4,69 ± 0,15
	<i>Lactobacillus sp.</i> 291	4,76 ± 0,18
Середній	<i>Lactobacillus sp.</i> 275	5,37 ± 0,02
	<i>Lactobacillus sp.</i> 1005	5,37 ± 0,02
	<i>Lactobacillus sp.</i> 202	5,38 ± 0,05
	<i>L. gasseri</i> АО 11	5,87 ± 0,07
	<i>Lactobacillus sp.</i> 925	5,92 ± 0,03
Високий	<i>L. helveticus</i> ATCC 15009	22,15 ± 0,67

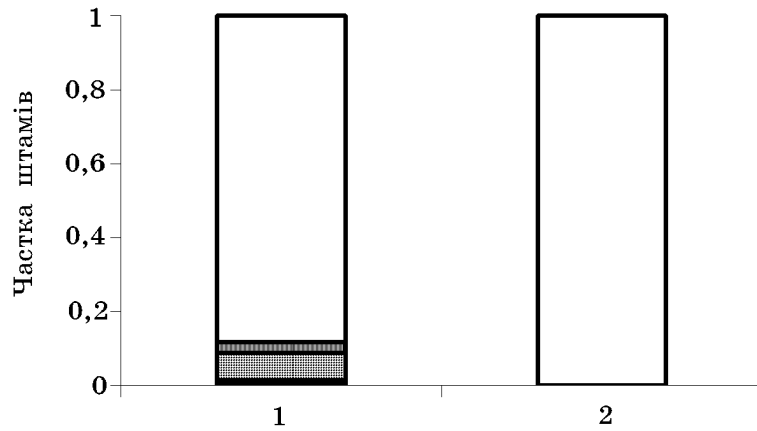


Рис. 1. Антикомплементарна активність штамів лактобацил через 6 місяців (1) і 18 місяців (2) після виділення.

- – штами з високим рівнем АКА
- ▒ – штами з середнім рівнем АКА
- ░ – штами з низьким рівнем АКА
- – штами з нульовим рівнем АКА

Як відомо, окрім продукції антидефенсинів, для усіх штамів, здатних персистувати всередині макроорганізму, одним з найважливіших показників є здатність до цитоадгезії. Тому дуже важливо зіставити показники адгезивності та антикомплементарної активності. За результатами наших попередніх досліджень [10], штами лактобацил, які були здатними інактивувати комплемент в гемолітичній системі, мали також високі показники адгезії. Дані про адгезивні властивості досліджуваних штамів наведено в табл. 2.

Таблиця 2

Здатність до цитоадгезії досліджуваних штамів лактобацил

Штам	Середній показник адгезії (СПА)
<i>Lactobacillus sp.</i> 17	4,94 ± 0,40
<i>Lactobacillus sp.</i> 291	7,52 ± 0,35
<i>Lactobacillus sp.</i> 275	5,60 ± 0,53
<i>Lactobacillus sp.</i> 1005	6,32 ± 0,43
<i>Lactobacillus sp.</i> 202	7,08 ± 0,47
<i>L. gasseri</i> AO 11	4,32 ± 0,36
<i>Lactobacillus sp.</i> 925	4,40 ± 0,46
<i>L. helveticus</i> ATCC 15009	4,60 ± ,028

Як видно з даних таблиці, всі штами, здатні інактивувати комплемент, для персистенції в макроорганізмі використовували також адгезивну функцію. АКА для них могла відігравати додаткову роль у здатності до тривалого знаходження всередині макроорганізму.

Нездатність лактобацил інактивувати лізоцим та поступова втрата здатності деяких штамів інактивувати комплемент свідчить про відсутність можливої імунодепресивної дії даних штамів та про незначну роль АЛА і АКА в персистенції лактобацил всередині організму людини.

Роботу виконано в рамках проекту, підтриманого Грантом Президента України № 16 для обдарованої молоді.

Література:

1. Брудастов Ю. А., Вальшев А. В., Брудастов А. Н. Антикомплементарная активность производственного штамма *Bacillus cereus* IP 5832 и энтеробактерий при их совместном культивировании // Журн. микробиол. — 1996. — № 3. — С. 91 — 93
2. Бухарин О. О. Биомедицинские аспекты персистенции бактерий // Журн. микробиол. — 1994. — № 4 (приложение). — С. 4 — 13.
3. Бухарин О. В., Немцева Н. В., Ананьина Г. Е., Сидоров В. В. Антилизоцимная активность внутриклеточно паразитирующих бактерий. В сборнике трудов: Факторы естественного иммунитета при различных физиологических и патологических состояниях. Тезисы докладов к VIII зональной научной конференции. — Вып. 9. — Челябинск, 1984. — 180 с.

4. Брудастов Ю. А. Антикомплементарная активность бактерий. Автореф. дис. канд. мед. наук. – Челябинск, 1992. – 32 с.
5. Hawiger J. Frequency of staphylococcal lysozyme production tested by plate method. // J. Clin. Path. – 1968. – V. 21. – № 3. – P. 390 – 393.
6. Бухарин О. В., Васильев Н. В. Лизоцим и его роль в биологии и медицине. Томск, 1974. – 212 с.
7. Бухарин, Вальшев, Елагина, Иванов, Черкасов. Фотометрическое определение антилизоцимной активности // Журн. микробиол. – 1997. – № 4. – С. 117 – 120.
8. Ленцнер А. А., Ленцнер Х. П., Тоом М. А. О способности лактобацилл микрофлоры человека продуцировать лизоцим // Журн. микробиол. – 1975. – № 8. – С. 77 – 81.
9. Иммунология: Практикум / Е. У. Пастер, В. В. Овод, В. К. Позур, Н. Е. Вихоть. – К.: Выща шк. Изд-во при Киев. Ун-те, 1989. – 304 с.
10. Кур'ята Н. В. Адгезивні та гемаглютинуючі властивості лактобацилл // Біорізноманіття природних і техногенних біотопів України: Матеріали Всеукраїнської конференції студентів, аспірантів та молодих вчених (19 – 22 листопада 2001 р.). – Ч. II. – Донецьк: ДонНУ, 2001. – С. 24 – 27.

Н. В. Курьята, Н. А. Елинская

Одесский национальный университет им. И. И. Мечникова,
кафедра микробиологии и вирусологии,
ул. Дворянская, 2, Одесса, 65026, Украина

**СПОСОБНОСТЬ ШТАММОВ ЛАКТОБАЦИЛЛ ПРОДУЦИРОВАТЬ
АНТИДЕФЕНСИНЫ**

Резюме

Исследовали способность штаммов лактобацилл, выделенных из пищеварительного тракта детей, и коллекционных штаммов продуцировать антидефенсины. Установлено, что ни один штамм лактобацилл не был способен инактивировать лизоцим. У 11,8 % штаммов лактобацилл, которые сохранялись 6 месяцев, выявлена антикомплементарная активность (АКА), установлен её уровень. Показано, что при сохранении в течение 18 месяцев все штаммы лактобацилл утрачивали АКА.

Ключевые слова: лактобациллы, антидефенсины, лизоцим, комплемент

N. V. Kuryata, N. O. Yelynska

Odessa I. I. Mechnikov National University,
Department of Microbiology and Virology,
Dvoryanskaya St., 2, Odessa, 65026, Ukraine

**THE ABILITY OF LACTOBACILLI STRAINS TO ANTI-DEFENCIN
PRODUCITON**

Summary

The ability to anti-defencin production of intestinal and collection strains of lactobacilli was investigated. It has been shown that no lactobacilli strain was capable to lysozyme inactivation. In 11,8 % lactobacilli strains being preserved for 6 months anti-complement activity (ACA) has been found, its level has been determined. It has been shown that within 18 months all the strains of lactobacilli lost their ACA.

Key words: lactobacilli, anti-defencins, lysozyme, complement.