

ИЗУЧЕНИЕ «АНТИИНТЕРЦИДНОЙ» АКТИВНОСТИ У ГЕМОЛИТИЧЕСКИХ E. COLI, ВЫДЕЛЕННЫХ У БОЛЬНЫХ С СОМАТИЧЕСКИМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ ЖКТ

В экспериментах *in vitro* на 107 штаммов *Escherichia coli*, выделенных из разных источников (23 штамма от здоровых людей и 84 штамма от больных с заболеваниями ЖКТ), показано, что часть изолятов, преимущественно выделенных от больных, проявляют устойчивость к антибактериальному действию лейкоцитарного катионного белка «интерцида» (АИА) и высоким уровнем антилизосимной активности. Среди групп гемолитических *E. coli*, лактозонегативные штаммы достоверно чаще проявляли активность к «интерциду» и у них же наибольший процент совпадения изолятов с АИА и АЛА в высоких концентрациях.

Катионные белки нейтрофилов и макрофагов, локализованные в лизосомах клеток, являются эффекторами кислороднезависимого киллинга бактерий и относятся к факторам неспецифической антибактериальной резистентности макроорганизма (6). Летальное действие катионных белков связывают с индуцированным нарушением структуры и функции клеточной стенки (возможно цитоплазматической мембраны) макроорганизмов (4).

К этой группе факторов относится выделенный из лейкоцитов человека катионный термостабильный белок с м.м. 11,0-11,5 кД, обладающий широким спектром антибактериальной активности, названный «интерцидом» (2). Многие грамотрицательные микроорганизмы, в частности энтеробактерии, способны не только противостоять летальному действию «интерцида», но и ингибировать его в среде культивирования, т.е. проявлять «антиинтерцидную активность» (2, 7). Этот признак среди штаммов *Escherichia coli*, изолированных от больных людей, встречался в несколько раз чаще, чем в группах бактериальных изолятов, выделенных от здоровых лиц и из внешней среды (5, 7). Цель нашей работы - изучить устойчивость гемолитических эшерихий, выделенных от больных с заболеваниями ЖКТ, к антибактериальному действию «интерцида».

Исследовано 107 штаммов *Escherichia coli*, из них 23 штамма банальных типичных эшерихий, выделенных от здоровых людей, и 84 штамма гемолитических *Escherichia coli*, выделенных от больных с заболеваниями ЖКТ (желчекаменная болезнь, ЯБЖ и ДП, СРК, СЯР).

Исследуемые культуры были объединены в группы:

I группа - типичные *E. coli*, выделенных от здоровых людей-

II группа включала лактозонегативные *E. coli* Hly+lac- - 18 штаммов;

III группа- 28 штаммов *E. coli* Hly+ с выраженной ферментативной активностью - смб (с металлическим блеском);

IV группа- 38 штаммов *E. coli* Hly+ со сниженной ферментативной активностью- бмб (без металлического блеска).

Все выделенные штаммы обладали типичными культуральными, морфологическими и биохимическими свойствами. Дополнительно у них определялась «антиинтерцидная активность»- АИА (1,7).

В опытах использовали экспериментальный образец препарата «интерцида» (серия 2), полученный на базе Уфимского НИИВС им. И.И. Мечникова из полуфабриката жидкого человеческого лейкоцитарного интерферона методом селективной ультрафильтрации с применением мембранной технологии и представляющий собой сухой порошок желто-розового цвета, хорошо растворимый в воде. Антибактериальная составляющая интерферона выделена в виде вещества «интерцида».

Для обнаружения способности инактивировать бактерицидную основу «интерцида», готовили ряд чашек Петри с питательным агаром, содержащим препарат человеческого лейкоцитарного интерферона (ПЧЛИ) в различных концентрациях - от 0 до 7 ед. (одна единица соответствует концентрации препарата 1 МБК для индикаторной культуры *Corynebacterium xerosis* № 181). К 7,5 мл расплавленного 1,5% питательного агара добавляли от 0 до 0,9 мл рабочего раствора ПЧЛИ. Рабочий раствор готовили растворением сухого

вещества ампулы в 2 мл 0,85% раствора хлорида натрия. На поверхность подсушенных сред «пятачками» засеивали исследуемые суточные агаровые культуры эшерихий. После инкубации в термостате при 37°C в течении 24ч, выросшие колонии убивали парами хлороформа и заливали вторым слоем (3-4 мл) полужидкого (0,6-0,7%) агара, смешанного с 0,1 мл взвеси суточной агаровой культуры *Corynebacterium xerosis*. Взвесь содержит 10^8 клеток. Учет производили после 24 ч инкубации при 37°C. О наличии «антиинтерцидной» активности у эшерихий судили по наличию роста дифтероида на поверхности и вокруг колоний исследуемых эшерихий, свидетельствующего о нейтрализации бактерицидного компонента препарата интерферона в среде (1).

Результаты

Результаты оценки влияния «интерцида» на развитие 107 штаммов *E.coli*, выделенных из разных источников, свидетельствовали о значительной межгрупповой вариабельности устойчивости эшерихий к антибактериальному действию данного катионного белка.

Наиболее ярко отличия по устойчивости к «интерциду» проявились при сравнении культур *E.coli*, выделенных от больных, со штаммами эшерихий, изолированными из фекалий относительно здоровых людей. Так, типичные *E.coli* проявили устойчивость к «интерциду» в $17,4 \pm 7,8$ % случаев, что в 4,5-5,4 раза меньше, чем аналогичный показатель в выборках гемолитических *E.coli*. Средняя величина АИА также была значительно меньше и составила $0,1 \pm 0,04$ ед. Среди гемолитических эшерихий наиболее высокая частота устойчивости к «интерциду» отмечена у лактозонегативных штаммов - $94,4 \pm 5,6$ %, что превышает аналогичный показатель типичных эшерихий в 5,4 раза ($p < 0,001$). Слабоферментирующие *E.coli* Hly+ и штаммы с выраженной ферментативной активностью обладали АИА в $79,0 \pm 6,6$ и $78,6 \pm 7,7$ % случаев и в 4,5 раз превышали активность типичных эшерихий ($p < 0,001$). Как видно, среди гемолитических эшерихий наибольшую частоту устойчивости к «интерциду» проявили лактозонегативные штаммы - в 1,2 раза достоверно чаще, чем III группа ($p = 0,02$) и IV группа ($p > 0,05$, недостоверно). Между слабоферментирующими и с выраженной ферментативной активностью *E.coli* Hly+ не отмечено достоверной разницы в частоте встречаемости признака ($p > 0,5$).

По величине АИА, выраженной в единицах, активность штаммов отмечалась в разбросах: типичные эшерихии - 0,4-0,6 ед.; *E.coli* Hly+lac- - 0,6-0,7 ед.; *E.coli* Hly+ смб и бмб - 0,2-0,7 ед. таким образом, лактозонегативные гемолитические эшерихии проявили устойчивость к высоким концентрациям «интерцида», остальные группы гемолитических *E.coli* - к низким.

Средняя величина АИА также выше у *E.coli* Hly-lac- и составляет $4,45 \pm 0,8$ ед., что в 2,3-2,2 раза больше, чем у гемолитических штаммов *E.coli* с выраженной ферментативной активностью и слабоферментирующих - $1,9 \pm 0,4$ ($p < 0,01$) и $2,0 \pm 0,3$ ($p < 0,01$) ед. соответственно и в 44,5 раз больше, чем у банальной у *E.coli* - $0,1 \pm 0,04$ ($p < 0,001$). Гемолитические *E.coli* с выраженной ферментативной активностью и слабоферментирующих превышают среднюю величину АИА типичных эшерихий в 20,0-19,0 раз ($p < 0,001$).

Достоверной разницы в средней величине АИА среди *E.coli* Hly+ смб и бмб не отмечено ($p > 0,5$).

Поскольку выявленные отличия среди штаммов эшерихий разных групп обусловлены биологическими свойствами конкретных изолятов *E.coli*, у исследованных штаммов дополнительно определяли персистентные свойства, такие как наличие и уровень АЛА (антилизотимной активности) [таб.2]. Определяли соответствие показателей АЛА более 6 мкг/мл и АИА более 2 единиц у одних и тех же изолятов каждой группы. В группе типичных эшерихий соответствие АЛА и АИА обнаружено не было. Наибольшее количество соответствий обнаружено в группе *E.coli* Hly+ lac-: 10 штаммов из 17 проявили и АЛА и АИА - $58,8 \pm 11,9$ %, а 4 штамма не были активны по этим факторам - $23,5 \pm 6,0$ %. Слабоферментирующие гемолитические эшерихии в $43,3 \pm 9,0$ % случаев дали АЛА и АИА (13 штаммов из 30), отсутствие обоих признаков наблюдалось в $20,0 \pm 6,0$ % - у 6 изолятов. *E.coli* Hly+ с выраженной ферментативной активностью в $31,8 \pm 8,2$ % проявили соответствие (7 штаммов из 22), отсутствие активностей наблюдалось у 4 изолятов - $18,2 \pm 5,8$ %. Лактозонегативные эшерихии проявляли одновременно АЛА и АИА в 1,8 раз чаще, чем *E.coli* Hly+ с выраженной ферментативной активностью и в 1,4 раза чаще, чем слабоферментирующие *E.coli* Hly+.

Гемолитические штаммы эшерихий значительно чаще обладали персистирующими факторами, чем типичные формы (таб.3). Так $82,1 \pm 6,6$ % штаммов проявляли АИА и $35,8 \pm 5,9$ % штаммов АЛА к концентрации лизоцима 4-6 мкг/мл в, что в 5,7 и 2,6 раз чаще, чем банальные *E.coli*. Среди типичных эшерихий не встречались штаммы с АЛА более 6 мкг/мл, а *E.coli* Нly+ обнаруживали такую активность в $29,8 \pm 5,6$ %.

При изучении антилизоцимной активности у этих же изолятов в группе с АЛА к концентрации лизоцима 4,0-6,0 мкг/мл 24 штамма *E.coli* Нly+ проявили активность – $35,8 \pm 5,9$ %, тогда как типичная кишечная палочка только в $13,3 \pm 8,7$ % случаев, что в 2,7 раз больше. Из подгрупп гемолитических эшерихий наибольший процент встречаемости штаммов с данной АЛА также приходится на группу эшерихии с выраженной ферментативной активностью – $39,1 \pm 10,2$ % – в 2,9 раза чаще, наименьший – на лактозонегативные – $33,3 \pm 12,1$ % – в 2,5 раз чаще, чем изоляты типичных эшерихий.

Со степенью АЛА более 6 мкг/мл было выявлено 20 штаммов *E.coli* Нly+ ($29,8 \pm 5,6$ %). Среди типичных эшерихий АЛА к данной концентрации лизоцима обнаружена не была. Чаще АЛА определялась в группе лактозонегативных гемолитических эшерихий – в $53,3 \pm 12,9$ % случаев. С наименьшей – в группе *E.coli* с выраженной ферментативной активностью – $17,4 \pm 7,0$ % ($p < 0,02$) и в группе *E.coli* со сниженной ферментативной активностью – $27,6 \pm 8,3$ %, что в 3,1 и 1,9 раз соответственно меньше, чем лактозонегативные изоляты.

При изучении наличия обоих признаков персистенции видно, что гемолитические формы эшерихий достоверно чаще обладали ими, чем типичные *E.coli*. Из групп *E.coli* Нly+ лактозонегативные штаммы достоверно чаще проявляют АИА, а также АЛА к высоким концентрациям лизоцима (>6 мкг/мл).

Обсуждение

Представленные экспериментальные данные об антибактериальном действии «интерцида» на *E.coli* позволяют согласиться с оценкой катионных белков лейкоцитов как эффекторов фагоцитарного киллинга и факторов противoinфекционной резистентности макроорганизма (4,6). Высокая частота встречаемости штаммов, устойчивых к «интерциду», среди штаммов, выделенных от больных, очевидно, детерминированы биологическими свойствами изолятов. Подтверждением этому служат данные о взаимосвязи персистентных свойств как «антиинтерцидная» и антилизоцимная активности. Наличие у эшерихий «антиинтерцидной» активности оценивают как дополнительный механизм, обеспечивающий выживание *E.coli* при контакте с «интерцидом». Возможно устойчивость эшерихий к антибактериальному действию «интерцида» реализуется в виде нейтрализации катионного белка непосредственно на поверхности бактерий или в их периплазматическом пространстве (3).

Таким образом, изоляты гемолитических *E.coli*, выделенные от больных с соматическими заболеваниями ЖКТ, с высокой частотой обладают АИА, чем типичные эшерихии, выделенные от относительно здоровых людей. Среди групп гемолитических *E.coli*, лактозонегативные штаммы достоверно чаще проявляли активность к «интерциду» и у них же наибольший процент совпадения изолятов с АИА и АЛА в высоких концентрациях. Не отмечено достоверных различий по частоте и уровню АИА среди гемолитических эшерихий с выраженной и слабо выраженной ферментативной активностью. Можно допустить, что наличие гемолитического и отсутствие ферментативного признаков коррелируют с «антиинтерцидной» и антилизоцимной активностью и сообщают эшерихиям свойства, обеспечивающие выживание бактерий *in vivo* при встрече с эффекторами иммунитета хозяина и способствующие их персистенции в организме хозяина.

Литература:

1. Бухарин О.В. Персистенция патогенных бактерий. 1999. - с. 94-95.
2. Бухарин О.В., Усвяцев Б.Я. Бактерионосительство (медико-экологический аспект). - Екатеринбург, 1996.
3. Гриценко В.А., Шухман М.Г. // Журн. микроб.-2000.-№ 4.- с. 71-76.
4. Ждан-Пушкина С.М., Рыбакова Л.П. // Журн. микроб.-1991.-№7.- с. 5-8.
5. Ляшенко И.Э., Гриценко В.А. // Журн. микроб.-1996.-№3.-с. 110-114.
6. Маянский А.Н., Маянский Д.Н. Очерки о нейтрофиле и макрофаге.- Новосибирск, 1989.
7. Соколов В.Ю., Бухарин О.В. //Персистенция бактерий/. - Куйбышев.1990.- с. 83-93.