

С. И. Паранько, В. Г. Гаврилюк, Л. П. Голодок
Днепропетровский национальный университет

ИЗМЕНЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ В СВЯЗИ С ПРИОБРЕТЕНИЕМ АНТИБИОТИКОРЕЗИСТЕНТНОСТИ У СТАФИЛОКОККОВ

У результаті проведених досліджень були отримані 30 селекційованих варіантів стафілококів зі стійкістю до ряду антибіотиків, яка в 30–1000 разів перебільшує МІК для вихідних штамів. Були встановлені корелятивні зв'язки у зниженні патогенності і підвищенні персистенції на фоні придбання антибіотикостійкості. Отримані дані про інтенсифікацію окислювальних процесів у селекційованих до антибіотиків культур.

As a result of conducted research there were received 30 selected variants of staphylococci with antibiotic resistance in 30 to 1000 times higher than the MIC for wild strains. It was determined correlative links between the pathogenicity reduction and persistence increase in conditions of antibiotic resistance acquiring. It was received the data concerning the oxygenate processes intensification in cultures selected to antibiotics.

В последние десятилетия во многих странах мира наблюдается неуклонный рост бактериальных инфекций в структуре акушерско-гинекологических заболеваний. Частота этих инфекций в различных популяциях женщин варьирует от 30 до 80% обследованных. На общем фоне увеличения частоты специфических заболеваний (хламидиоз, трихомоноз, гонорея) наблюдается увеличение количества инфекций репродуктивного тракта, протекающих с участием микроорганизмов из состава нормальной микрофлоры влагалища. Стало очевидным, что нормальная микрофлора половых путей при определенных условиях способна проявлять патогенные свойства, а ее представители становятся возбудителями целого ряда болезней бактериальной этиологии. Это побуждает детально изучать влияние различных экзогенных и эндогенных факторов на состояние как микробиоценоза репродуктивного тракта в целом, так и на отдельных его представителей. Одним из самых мощных факторов отбора в популяции микроорганизмов, составляющих микробиоценоз слизистых оболочек макроорганизма, являются антибактериальные препараты. Широкое и, порой, нерациональное применение антибиотиков приводит к усугублению протекания заболевания, изменяет количественный и качественный состав микрофлоры, затрудняет диагностику и терапию инфекций. В связи с актуальностью проблемы, предметом исследования данной работы явилось изучение изменений биологических свойств представителей резидентной микрофлоры репродуктивного тракта женщин в результате приобретения антибиотикоустойчивости.

Материалы и методы исследования

Объектом исследований служили клинические штаммы стафилококков, выделенные из репродуктивного тракта беременных женщин, находящихся на стационаре с угрозой прерывания беременности. Определяли чувствительность выделенных штаммов стафилококков к антибиотикам методом посева на твердые

питательные среды, содержащие различные концентрации антибиотиков (МПА, 1,8%, рН=7,2–7,4).

Пассирование выделенных культур проводили на твердых средах (МПА, 1,8%, рН=7,2–7,4) с увеличивающимися концентрациями антибиотика. После проведения 20–30 пассажей определяли МИК у отселекционированных культур.

Сравнительный анализ биологических свойств исходных и селекционированных вариантов проводили по определению уровня гемолитической, лецитиназной, гиалуронидазной, желатиназной активностей, способности сбраживать маннит, а также антилизосимной активности (фотометрическим методом).

Определяли интенсивность окислительных процессов в клетках стафилококков полярографическим методом с использованием электрода Кларка закрытого типа. Результаты регистрировали по убыванию кислорода за определенный промежуток времени в закрытой ячейке в присутствии экзогенного субстрата (глюкозы) и в отсутствии субстратов (эндогенное дыхание). Скорость дыхания рассчитывали по формуле:

$$V = \frac{\Delta V_{O_2}}{\Delta t \times m},$$

где, V – интенсивность дыхания, $nM_{O_2} / мг \cdot мин$; ΔV_{O_2} – количество использованного кислорода, nM_{O_2} ; Δt – время, мин; m – масса белка, мг.

Все эксперименты проводили в 3–5 повторностях. Количество белка в пробе определяли с помощью метода Лоури.

Результаты и их обсуждение

Были отобраны 5 клинических штаммов стафилококков, идентифицированных как *Staphylococcus epidermidis*. Для каждой культуры были определены МИК ряда антибиотиков: бензилпенициллин, нетилмицин, цефепим, офлоксацин, эритромицин, тетрациклин.

С целью изучения изменения биологических свойств в зависимости от приобретения устойчивости к антибиотикам провели селекционирование изучаемых культур путем многократного пассирования на средах с возрастающими концентрациями антибиотиков. В результате были получены 30 вариантов с более высоким уровнем устойчивости к антибиотикам (табл. 1). Были получены штаммы с максимальным уровнем устойчивости к цефепиму и тетрациклину – 250 мкг/мл, к бензилпенициллину – 240 мкг/мл. С более низким уровнем устойчивости удалось отселекционировать варианты к нетилмицину и офлоксацину. Тем не менее, для всех полученных мутантов МИК исследуемых антибактериальных препаратов возросли в 30–1000 раз.

По данным ряда авторов были выявлены корреляционные закономерности в снижении патогенности и усилении персистенции у антибиотикоустойчивых штаммов различных микроорганизмов [2; 5]. В связи с этим было изучено проявление ряда свойств, относящихся к факторам патогенности и персистенности.

У селекционированных вариантов, устойчивых к антибиотикам, было отмечено снижение активности ряда ферментов, отвечающих за патогенность, по сравнению с исходными штаммами (рис. 1).

Таблица 1

МИК антибиотиков для селекционированных штаммов

Антибиотики	МИК исходных вариантов, мкг/мл		МИК селекционированных вариантов, мкг/мл		
	1	2	3	4	5
Бензилпенициллин	2 60	1 80	1 80	1,5 240	0,4 50
Нетилмицин	0,01 10	2 60	0,05 30	0,8 40	0,1 90
Цефипим	0,01 10	1,2 250	1 50	1,2 250	2,5 110
Офлоксацин	0,01 10	2 60	0,8 50	1 0	1 50
Эритромицин	0,01 10	1 50	1,2 60	7 180	1 40
Тетрациклин	3 100	2 60	1 50	1,5 250	6 190

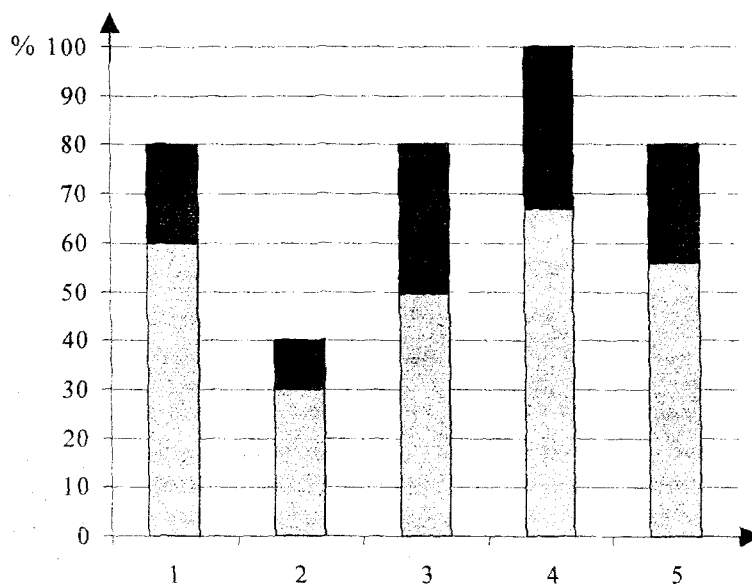


Рис. 1. Динамика изменения биологических свойств у стафилококков:

■ - исходные клинические штаммы, проявляющие данное свойство;

□ - селекционированные варианты;

1 - гиалуронидазная активность; 2 - лецитиназная активность; 3 - гемолитическая активность; 4 - желатиназная активность; 5 - расщепление маннита

Расщепление гиалуроновой кислоты было отмечено у 80% исходных вариантов; а у 25% резистентных штаммов, полученных от исходных, обладающих гиалуронидазной активностью, этот признак отсутствовал. Лецитиназная активность проявлялась у 40% исходных стафилококков и у 75% вариантов, полученных от лецитиназоположительных исходных культур. Редуцированная гемолитическая активность наблюдалась только у 62% резистентных культур. Способность ферментировать желатин была подавлена у 33% селекционированных вариантов по сравнению со 100% желатиназной активностью исходных штаммов.

Способность расщеплять маннит была установлена для 80% исходных и 70% селекционированных от них вариантов. Наибольшее количество штаммов с редуцированными биологическими свойствами было отмечено у вариантов, устойчивых к цефепиму и офлоксацину (37% и 42% соответственно).

Способность бактерий специфически инактивировать лизоцим хозяина была определена как их антилизозимная активность и оценена в персистенции микроорганизмов. Выяснилось, что этот признак встречается у большого количества видов микроорганизмов с преимущественным наличием у грамотрицательных бактерий. Закономерно встречался этот признак у носительских штаммов стафилококков. Экспериментальным путем было доказано, что антилизозимный признак можно рассматривать как маркер персистенции бактерий, способных к внутриклеточному паразитированию. Антилизозимный признак бактерий оказался конститутивным, секретируемым фактором, специфически взаимодействующим с лизоцимом и инактивирующим его. Как известно, широкий круг хозяев располагает лизоцимом как средством защиты, что в свою очередь стимулирует выработку антилизозимного фактора у бактерий, способных к персистенции. Большое значение для селекции наиболее стойких клонов с высоким уровнем антилизозимной активности имеет среда обитания, включая фагоцитирующие клетки организма. Способность паразита уклоняться от встречи с профессиональными фагоцитами хозяина общеизвестна, но в этом случае микробы пытаются проникнуть в иммунологически слабо защищенные клетки. Такой подходящей для них мишенью служат различные эпителиальные выстилки внутренних органов, защищенные лишь лизоцимом, где бактерии обосновываются.

В отношении факторов персистенции у селекционированных вариантов установлена прямая зависимость: с увеличением уровня устойчивости ко всем антибиотикам возрастала антилизозимная активность. Так, среднее значение АЛА у исходных вариантов составило 2,06 мг/мл, а у устойчивых – 2,73 мг/мл ($p < 0,05$).

Огромная неисследованная область открывается перед клиническими микробиологами, врачами, использующими антибиотики в качестве терапевтических средств для лечения больных в плане регулирующего их воздействия на персистентные свойства патогенов. Реальные субингибиторные концентрации антибиотиков в отношении патогенов, как правило, ограничиваются модификацией его характеристик, включая и персистентные свойства. Отсюда, необходимо сформулировать новый принцип отбора наиболее эффективных лекарственных средств, основанный на оценке действия препаратов на факторы персистенции бактерий. Подавление антибактериальным препаратом персистирующих свойств возбудителя затрудняет его паразитирование и тем самым повышает эффективность лекарственного воздействия. Представленная позиция должна быть интересна для врача тем, что позволяет с иной стороны (проблемы персистенции патогена) подойти к возможной ревизии применяемых средств антибактериальной терапии, которая в ряде случаев нуждается в безусловном пересмотре в связи с расширением наших знаний о механизмах персистенции микроорганизмов.

Как известно, условно патогенные микроорганизмы рода *Staphylococcus* обладают высокими адаптивными способностями, что в первую очередь обусловлено большой лабильностью процессов энергетического метаболизма. По данным ряда исследователей были установлены факты изменения активности ферментов катаболизма от присутствия в клетках стафилококков детерминант антибиотикорезистентности [1; 3; 4]. В связи с этим нам представилось интересным

изучить интенсивность эндогенного дыхания и катаболического расщепления глюкозы у антибиотикорезистентных вариантов в сравнении с исходными клиническими штаммами. В результате проведенных исследований было установлено, что интенсивность эндогенного дыхания у резистентных штаммов составила в среднем $31,57 \text{ нМ}_{\text{O}_2} / \text{мг} \cdot \text{мин}$, а у исходных – $22,28 \text{ нМ}_{\text{O}_2} / \text{мг} \cdot \text{мин}$ ($p < 0,05$), что показывает разницу 42%. При изучении окислительных процессов при расщеплении глюкозы также была отмечена интенсификация процессов потребления кислорода на 30% – у устойчивых вариантов по сравнению с исходными штаммами ($36,77$ и $28,38 \text{ нМ}_{\text{O}_2} / \text{мг} \cdot \text{мин}$ соответственно).

На основе полученных результатов можно заключить, что формирование устойчивости к антибактериальным препаратам коррелируют с изменением различных биологических свойств у стафилококков в сторону снижения патогенности и увеличения персистенции и приводит к интенсификации процессов как эндогенного, так и экзогенного дыхания.

Бібліографічні посилання

1. Гаврилюк В. Г. Энергетические процессы плазмидосодержащих штаммов и их роль в обеспечении конъюгации у стафилококков: Дисс. ... канд. биол. наук. – Днепропетровск, 1994.
2. Дерябин Д. Г., Шагинян И. А. Вирулентность и персистенция стафилококков: фенотипические проявления и механизмы генетического контроля // Журн. микробиология. – 2000. – № 4. – Приложения. – С. 36-43.
3. Козицкая С. Н. Особенности процессов катаболизма углеводов у плазмидосодержащих штаммов стафилококков / С. Н. Козицкая, Л. П. Голодок, А. И. Винников // Укр. биохим. журнал. – 1999. – Т. 71, № 3. – С. 26–29.
4. Крисенко О. В., Вінніков А. І. Активність ферментів циклу трикарбонових кислот у стійких та чутливих до антибіотиків штамів *Neisseria gonorrhoeae* // Мікробіол. журн. – 2004. – Т. 66, № 6. – С. 3–9.
5. Von Eiff C. A site-directed *Staphylococcus aureus* hemB mutant is a small-colony variant which persists intracellularly / Heilmann C., Proctor R. A., Woltz C., Peters G., Gotz F. // J Bacteriol. – 1997 Aug. – V. 179. – №. 15. – P. 4706–4712.

Надійшла до редколегії 14.02.05