

АНТИОКСИДАНТНЫЕ ФЕРМЕНТЫ МИКРООРГАНИЗМОВ КАК ПОТЕНЦИАЛЬНЫЕ ФАКТОРЫ ПАТОГЕННОСТИ

Доц. А. И. КУРБАНОВ

ANTIOXIDANT ENZYMES OF MICROORGANISMS AS POTENTIAL FACTORS OF PATHOGENECITY

A. I. KURBANOV

*Азербайджанский медицинский университет, Баку,
Азербайджанская Республика*

Рассмотрены основные субстраты, составляющие антиоксидантную систему микроорганизмов (каталаза, пероксидаза, супероксиддисмутаза и др.). Приведены данные об их роли в фагоцитозе и вирулентности микроорганизмов как факторов патогенности микроорганизмов.

Ключевые слова: микроорганизмы, каталаза, пероксидаза, супероксиддисмутаза, фагоцитоз, вирулентность.

Main substrates composing antioxidant system of microorganisms (catalase, peroxidase, superoxide dismutase et al.) are discussed. The data about their role in phagocytosis and virulence of microorganisms as factors of microorganism pathogenicity are given.

Key words: microorganisms, catalase, peroxidase, superoxide dismutase, phagocytosis, virulence.

Исследование факторов патогенности микроорганизмов — постоянная проблема медицинской микробиологии, поскольку они являются ведущими в патогенезе инфекционных заболеваний. Почти все стадии инфекционного процесса: внедрение микроорганизмов в организм, размножение их в его внутренних средах, болезнетворное действие на ткани и клетки хозяина — обуславливаются патогенным действием указанных факторов. Среди них хорошо известны ферменты: гиалуронидаза, нейраминидаза, фибринолизин, коллагеназа, плазмокоагулаза, ДНК-аза, уреазы, декарбоксилазы и т. п. Некоторые из этих ферментов за счет разрушительных свойств выполняют и трофические функции, поставляя микробам низкомолекулярные продукты распада клеток и тканей макроорганизма, необходимых для их жизнедеятельности. Кроме того, существуют ферменты, которые выполняют метаболические функции, но в определенных условиях могут проявлять себя и как факторы патогенности. С этой точки зрения представляют интерес антиоксидантные ферменты микроорганизмов.

Разные ферменты, участвующие в нейтрализации свободных радикалов, такие как каталаза, пероксидазы, супероксиддисмутаза (СОД) и т. п., защищают микроорганизмы от экзогенных и эндогенных окислительных стрессов. Образовавшийся в метаболических процессах токсичный субстрат — супероксидный ион (O_2^-) — с помощью фермента СОД превращается в перекись водорода (H_2O_2). В свою очередь она расщепляется ферментом ката-

лаза на молекулярный кислород и воду. Защитное действие в этом процессе оказывают и пероксидазы, которые окисляют органические вещества перекисью водорода, в результате чего образуется молекула воды. Таким образом, ферменты СОД и каталазы превращают супероксидные радикалы в безвредный кислород [1, 2].

Внешними окислительными агентами могут быть разные химические, в том числе антисептические и лекарственные средства. Например, перекись водорода и перманганат калия давно применяются в медицинской практике как антисептические препараты. Микробоцидный механизм данных препаратов связан с окислительным действием их на структурные элементы микроорганизмов [3].

К внешним окислительным факторам относятся и факторы, действующие на микроорганизмы в организме хозяина. После внедрения в организм микроорганизмы сталкиваются с первой линией защитной системы организма — неспецифическими факторами иммунитета, одним из которых является фагоцитоз. В последнее время ведутся интенсивные исследования роли антиоксидантных ферментов в защите от окислительного стресса фагоцитов. Известно, что основным механизмом обезвреживания микроорганизмов при их фагоцитозе является кислородозависимый механизм. При этом фагоциты уничтожают поглощенные микроорганизмы с помощью свободных кислородных радикалов, таких как супероксидный ион — O_2^- гидроксильный радикал — OH^- , синглетный

кислород — $^1\text{O}_2$, оксид азота — NO и др. Они же, в свою очередь, могут нейтрализоваться антиоксидантной системой микроорганизмов, в частности каталазой и СОД.

Таким образом, микроорганизмы приобретают резистентность и адаптацию к характерному для фагоцитов окислительному стрессу, вследствие чего они выживают в очаге воспаления, а нередко и внутри фагоцитов [4]. Так, для штаммов *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* и *Candida albicans*, обладающим максимальной активностью каталазы и СОД, характерна относительно высокая выживаемость внутри макрофагов по сравнению со штаммами с минимальной активностью этих ферментов [5]. Обнаружено, что разные штаммы *Mycobacterium tuberculosis* по уровню каталазы-пероксидазы проявляют разную устойчивость к внешнему H_2O_2 и отличаются по скорости размножения внутри моноцитов периферической крови человека [6]. Установлено также, что в ходе инфекционного процесса (при переходе из фазы альтерации к фазе персистенции) активность СОД и каталазы-пероксидазы *S. aureus* увеличивается. Это указывает на важную роль данных ферментов в устойчивости стафилококков к кислородозависимым бактерицидным механизмам нейтрофильных фагоцитов [7]. Показано, что внутриклеточные антиоксидантные ферменты — каталаза и СОД гриба *C. albicans* — обеспечивают относительно высокую выживаемость внутри макрофагов [8]. Мутанты *Cryptococcus neoformans var. gatti* с дефицитом Cu-Zn-СОД, полученные с трансформацией, ничем не отличались от дикого типа, однако были очень чувствительны к киллингу человеческими нейтрофилами [9]. СОД-мутантные штаммы *Shigella flexneri* были более чувствительными к перитонеальным макрофагам мышей и киллингу полиморфноядерных лейкоцитов человека [10]. Очень небольшое количество Mn-SOD-мутантных штаммов *Streptococcus agalactiae* обнаруживалось внутри макрофагов через 3 ч после их взаимодействия, в то время как дикие штаммы имелись там в значительном количестве [11].

Таким образом, антиоксидантные ферменты микроорганизмов обеспечивают относительно высокую выживаемость внутри фагоцитов. Механизм данного явления однозначно можно объяснить антифагоцитарной активностью каталазы и СОД. Так, защищая микробные клетки от действия кислородных радикалов внутри фагосом, эти ферменты способствуют более длительному выживанию микроорганизмов внутри фагоцитов. По вышеуказанному механизму эти ферменты могут противостоять микробоцидному действию фагоцитов.

Роль антиоксидантных ферментов в вирулентности микроорганизмов доказана в исследованиях последних лет. В результате изучения вирулентности шести штаммов *M. tuberculosis* было выяснено, что низкий уровень вирулентности связан

с восприимчивостью этих бактерий к H_2O_2 [12]. Изучена роль СОД *Helicobacter pylori* в колонизации слизистой оболочки желудка экспериментальных животных. В модели на мышах колонизация обнаружена только у одной из 23 мышей, которых инокулировали СОД-дефицитным штаммом, в то время как у 15 из 17 мышей обнаружена колонизация диким типом [13]. Установлено, что внутриклеточные антиоксидантные ферменты — каталаза и СОД гриба *C. albicans* — обеспечивают более высокую обсемененность внутренних органов белых мышей при экспериментальной инфекции [14]. Мутанты *Cryptococcus neoformans var. gatti* с дефицитом Cu-Zn-СОД, полученные трансформацией, ничем не отличались от дикого типа, однако обладали значительно меньшей вирулентностью для мышей [9].

Гистологические исследования кишечной стенки кроликов, зараженных СОД-дефицитными мутантами *Shigella flexneri*, показало, что мутантные штаммы вызывают незначительные изменения тканей в сравнении с диким штаммом этой бактерии [10]. Активность ферментов каталазы и СОД у вирулентных и авирулентных штаммов золотистых стафилококков значительно различается [15]. Так, если каталазная активность вирулентных штаммов в клеточном лизате составляет 260 ± 120 kat, а авирулентные штаммы имеют 31 ± 19 kat, СОД-активность у вирулентных и авирулентных штаммов составляла соответственно $20,85 \pm 11,48$ U и $5,39 \pm 2,89$ U. Mn-SOD-дефицитные мутанты *S. agalactiae* быстрее элиминировались из внутренних органов — мозга, селезенки и из крови — по сравнению с контрольными штаммами [11]. После заражения мышей мутантным по SOD штаммом *Neisseria meningitidis* выжило 14 из 25 животных, в то время как после заражения диким штаммом этого микроба — только 6 из 25 [16].

Итак, при экспериментальных инфекциях доказана роль антиоксидантных ферментов микроорганизмов в персистенции во внутренних органах. Механизм данного явления можно объяснить антифагоцитарной активностью каталазы и СОД: защищая микробные клетки от действия кислородных радикалов внутри фагосом, эти ферменты способствуют более длительному выживанию микроорганизмов. Персистенция микроорганизмов в организме ухудшает течение инфекционного процесса и тем самым обуславливает более высокое содержание их во внутренних органах. Следовательно, антиоксидантные ферменты являются одним из факторов патогенности.

Механизм участия антиоксидантных ферментов в патогенности можно объяснить следующим образом. В процессе фагоцитоза микроорганизмы уничтожаются кислородозависимым механизмом с помощью кислородных радикалов, т. е. микроорганизмы подвергаются действию сильных оксидантов. Нейтрализуя указанные оксиданты, антиоксидантная система микроорганизмов защищает их от действия фагоцитов. В таких случаях повы-

шается устойчивость внутри фагоцитов и ослабляется внутриклеточный киллинг, вследствие чего элиминация микроорганизмов из организма запаздывает. Таким образом, антиоксидантные ферменты играют определенную роль в патогенности микроорганизмов.

Косвенным показателем роли антиоксидантных ферментов микроорганизмов в их патогенности может быть участие этих ферментов в иммунных реакциях. В результате экспериментальных исследований установлено, что штаммы *C. albicans* с минимальной активностью антиоксидантных ферментов индуцируют относительно более выраженный иммунный ответ в ранние сроки заражения по сравнению со штаммами с максимальной активностью этих ферментов. Но в дальнейшем интенсивность иммунного ответа против штаммов *C. albicans* с минимальной активностью этих ферментов была ниже, чем интенсивность иммунного ответа против штамма с максимальной активностью ферментов [17].

Антиоксидантные ферменты микроорганизмов, как каталаза и СОД, могут быть потенциально перспективными для создания препаратов иммунологической защиты против инфекций [18]. Иммунизация ферментом каталазы формирует иммунный ответ к микроорганизму, который содержит этот фермент. Некоторым исследователям [19] удалось получить клонированный вакцинный штамм, перенося ген каталазы *H. Pylori* в живые клетки *Salmonella typhimurium*. У 8 из 13 мышей, вакцинированных этим штаммом, наблюдалась протективная реакция против *H. pylori* с повышением уровня IgG2a. Изучена протективная роль каталазы, полученной из муконидного штамма *P. aeruginosa* с молекулярной массой 60 кДа при экспериментальной респираторной инфекции крыс. Иммунизацию ферментом производили введением внутрь пейеровых бляшек или интра трахеальным введением. Иммунизация значительно повышала клиренс гомологичных и гетероген-

ных штаммов *P. aeruginosa*, активность бронхоальвеолярных фагоцитов, индуцировала проявление специфических антикаталазных антител, а также каталазаспецифическую пролиферацию клеток, полученных из мезентеральных лимфатических узлов иммунизированных животных [20]. В подобных исследованиях обнаружилось значительное протективное действие и фермента СОД. Например, СОД у *Brucella abortus* является Т-зависимым антигеном, который индуцирует пролиферацию Т-клеток и продукцию гамма-интерферона у инфицированных мышей [21]. Так, вакцинация мышей клетками *Escherichia coli*, экспрессирующего фермент Cu-Zn-SOD *B. abortus*, формировала существенную защиту против бруцелл [22]. Использование с этой же целью плазмидной ДНК, включающей Cu-Zn-SOD ген *B. abortus*, также индуцировало гуморальный и клеточный иммунный ответ против возбудителей бруцеллеза. Протективный эффект этой вакцинации был сходен с вакцинацией штаммом *B. abortus* RB51 [23]. Штамм *C. albicans* с максимальным содержанием каталазы и СОД индуцировал относительно более выраженный иммунный ответ у мышей по сравнению со штаммом с минимальным содержанием этих ферментов [24]. Дальнейшие исследования, проведенные нами, показали возможность участия каталазы и СОД в индукции специфического иммунного ответа против других микроорганизмов [18]. Так, иммунный ответ (титры антител и интенсивность гиперчувствительности замедленного типа) против микроорганизмов, отличающихся по активности антиоксидантных ферментов, зависели от активности этих ферментов.

Таким образом, антиоксидантные ферменты защищают микроорганизмы от окислительных субстратов, образующихся не только в результате метаболических процессов, но и в процессе фагоцитоза фагоцитирующими клетками, и тем самым играют роль фактора патогенности.

Литература

1. Fridovich I. Superoxide anion radical and superoxide dismutases // An. Rev. Biochem.— 1995.— Vol. 64.— P.97–112.
2. Fridovich I. Superoxide anion radical (O₂⁻), superoxide dismutases, and related matters // JBC Online.— 1997.— Vol. 272 (30).— P. 18515–18517.
3. Машковский М. Д. Лекарственные средства: В 2 т. Харьков: Торсинг, 1998.— Т. 2.— 592 с.
4. Рябиченко Е. В., Бондаренко В. М., Рябиченко В. В. Роль активных форм кислорода, генерируемых фагоцитами, в патогенезе заболеваний // Журн. микробиол.— 2000.— № 4.— С. 65–71.
5. Курбанов А. И., Караев З. О. Роль каталазы и супероксиддисмутазы микроорганизмов при их фагоцитозе макрофагальными клетками // Биомед.— 2005.— № 3.— С. 44–45.
6. Mycobacterium tuberculosis catalase and peroxidase activities and resistance to oxidative killing in human monocytes in vitro / C. Manca, S. Paul, C. E. Barry et al. // Inf. Immun.— 1999.— Vol. 67 (1).— P. 74–79.
7. Брудастов Ю. А., Сборец Т. С., Дерябин Д. Г. Активность каталазы и супероксиддисмутазы *Staphylococcus aureus* при их персистенции в макроорганизме // Журн. микробиол.— 2001.— № 2.— С. 13–16.
8. Курбанов А. И. Внутриклеточные антиоксидантные ферменты *Candida albicans* при фагоцитозе макрофагами // Пробл. мед. микологии.— 2005.— Т. 7, № 2.— С. 105–106.
9. Characterization of Cu, Zn superoxide dismutases (SOD1) gene knock-out mutant of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*: role in biology and virulence / S. D. Narasipura, J. G. Ault, M. J. Behr et al. // Mol. Microbiol.— 2003.— Vol. 47 (6).— P. 1681–1694.
10. Franzone V., Arondel J., Sansonetti P. Contribution of superoxide dismutase and catalase activities to *Shigella*

- flexneri pathogenesis // *Inf. Immun.*— 1990.— Vol. 58, № 2.— P. 529–535.
11. Contribution of Mn-cofactored superoxide dismutase (SodA) to the virulence of *Streptococcus agalactiae* / C. Poyart, E. Pellegrini, O. Gaillot et al. // *Inf. Immun.*— 2001.— Vol. 69, № 8.— P. 5098–5106.
 12. *Jackett P. S., Aber V. R., Lowrie D. B.* Virulence and resistance to superoxide, low pH and hydrogen peroxide among strains of *Mycobacterium tuberculosis* // *J. Gen. Microbiol.*— 1978.— Vol. 104 (1).— P. 37–45.
 13. Superoxide dismutase-deficient mutant of *Helicobacter pylori* are hypersensitive to oxidative stress and defective in host colonization / W. Richard, R. W. Seyler, J. W. Olson, R. J. Maier // *Inf. Immun.*— 2001.— Vol. 69 (6).— P. 4034–4040.
 14. *Курбанов А. И.* Обсемененность внутренних органов белых мышей при экспериментальных инфекциях, вызванных микроорганизмами, отличающимися по содержанию антиоксидантных ферментов // *Биомед.*— 2006.— № 2.— С. 31–33.
 15. *Kanafani H., Martin S.* Catalase and superoxide dismutase activities in virulent and nonvirulent *Staphylococcus aureus* isolates // *J. Clin. Microbiol.*— 1985.— Vol. 21, № 4.— P. 607–610.
 16. Periplasmic superoxide dismutase in meningococcal pathogenicity / K. Wilks, K. Dunn, J. Farrant et al. // *Inf. Immun.*— 1998.— Vol. 66, № 1.— P. 213–217.
 17. *Курбанов А. И.* Экспериментальное изучение роли антиоксидантных ферментов *Candida albicans* в патогенезе кандидоза // *Пробл. мед. микологии.*— 2008.— Т. 10, № 2.— С. 14–16.
 18. *Kurbanov A. I., Karaev Z. O., Bayramov R. B., Topchieva Sh.* Perspective of microbial enzymes use as vaccine preparation // *Plant & microbial enzymes: isolation, characterization & biotechnology applications.*— Tbilisi: Georgia, 2007.— P. 66–67.
 19. Immunization with attenuated *Salmonella typhimurium* producing catalase in protection against gastric *Helicobacter pylori* infection in mice / M. Chen, J. Chen, W. Liao et al. // *Helicobacter.*— 2003.— Vol. 8, № 6.— P. 613–625.
 20. Catalase immunization from *Pseudomonas aeruginosa* enhances bacterial clearance in the rat lung / L. Thomas, M. Dunkley, R. Moore et al. // *Vaccine.*— 2000.— Vol. 19, № 2–3.— P. 348–357.
 21. Evaluation of *Brucella abortus* DNA vaccine by expression of Cu-Zn superoxide dismutase antigen fused to IL-2 / A. Gonzalez-Smith, R. Vemulapalli, E. Andrews, A. Onate // *Immunobiology.*— 2006.— Vol. 211, № 1–2.— P. 65–74.
 22. Vaccination with live *Escherichia coli* expressing *Brucella abortus* Cu/Zn superoxide dismutase protects mice against virulent *B. Abortus* / A. Onate, R. Vemulapalli, E. Andrews et al. // *Inf. Immun.*— 1999.— Vol. 67, № 2.— P. 986–988.
 23. A DNA vaccine encoding Cu,Zn superoxide dismutase of *Brucella abortus* induces protective immunity in BALB/c mice / A. A. Onate, S. Cespedes, A. Cabrera et al. // *Inf. Immun.*— 2003.— Vol. 71, № 9.— P. 4857–4861.
 24. *Курбанов А. И., Караев З. О.* Особенности инфекционного и иммунного процесса, вызванного штаммами *Candida albicans*, отличающимися по содержанию антиоксидантных ферментов // *Пробл. мед. микологии.*— 2006.— Т. 8, № 2.— С. 55–56.

Поступила 29.10.2008