

МІКРОБІОЛОГІЯ

УДК 579.873.2:577.15:615.33

ОСОБЛИВОСТІ ЗМІН ФЕРМЕНТАТИВНОЇ АКТИВНОСТІ МІКОБАКТЕРІЙ ПІД ДІЄЮ СОЛЕЙ ФЛУРЕНІЗИДУ

О. Зарічна

*Науково-дослідний інститут епідеміології та гігієни МОЗ України
вул. Зелена, 12, Львів 79005, Україна
e-mail: ndi-labepid@i.ua*

Вивчено зміни каталазної, пероксидазної, нітратредуктазної, глутаматдегідрогеназної, глюкозодегідрогеназної, сукцинатдегідрогеназної, алкогольдегідрогеназної активності мікобактерій туберкульозу *Mycobacterium tuberculosis H₃₇Rv*, *M. bovis 8* і атипових мікобактерій *M. scrofulaceum 526* після дії на них флуренізиду, ізоніазиду та 5 нових субстанцій, які є солями вітчизняного протимікробного препарату флуренізиду.

Ключові слова: мікобактерії туберкульозу, солі флуренізиду, ферментативна активність.

Патогенні для людини штами мікобактерій здатні проникати, виживати і рости в макрофагах. Внутрішньоклітинний бактеріальний ріст залежить від властивості уникати дії лізуючих макрофагальних ферментів, активованих атомів кисню й активованих нітратних сполук. Отже, взаємодії між клітинами макроорганізмів і мікобактеріями є тонко збалансованими [7, 10]. Капсула, що оточує мікобактерію, є пасивним бар'єром, який заважає дифузії макромолекул у клітину. Крім того, мікобактеріями секретуються ферменти, які спричиняють детоксикаційну дію і є факторами активної стійкості мікобактерій до бактерицидних механізмів. Зокрема, пероксидаза, каталаза, нітратредуктаза та дегідрогенази [2, 7–9, 13].

Для виявлення впливу солей флуренізиду на мікобактерії було вивчено активність деяких ферментів до і після дії на культури мікобактерій досліджуваних речовин.

Матеріали та методи

Вивчено зміни ферментативної активності мікобактерій туберкульозу *Mycobacterium tuberculosis H₃₇Rv*, *M. bovis 8* й атипових мікобактерій *M. scrofulaceum 526*, після дії на них флуренізиду, ізоніазиду та 5 нових субстанцій, які є похідними вітчизняного протимікробного препарату флуренізиду (N-(9-флуореніліден)-N'-ізонікотингідрозиду), а саме його срібною, натрієвою, калійною, кальцієвою та літієвою солями (шифр хіміка ЛІ-45, ЛІ-53, ЛІ-54, ЛІ-69, ЛІ-72 відповідно) (див. рисунок), отриманих професором Л. І. Петрух у Львівському національному медичному університеті ім. Данила Галицького.

Вивчали активність ферментів каталази, пероксидази, нітратредуктази, глутаматдегідрогенази, глюкозодегідрогенази, сукцинатдегідрогенази, алкогольдегідрогенази, при дії на культури мікобактерій вищеназваних сполук у концентраціях, які застосовуються при дослідженні чутливості мікобактерій до ізоніазиду та флуренізиду, а саме 40 та 20 мкг/мл.

Досліджувані штами мікобактерій *M. tuberculosis H₃₇Rv*, *M. bovis 8*, *M. scrofulaceum 526* отримані з Інституту фтизіатрії і пульмонології ім. Ф.Г. Яновського АМН України та з Державного НДІ стандартизації і контролю медичних біологічних препаратів ім. Л.О. Тарасевича (Росія).

Штами мікобактерій засівали на класичне середовище Левенштейна-Єнсена. Густина мікробної суспензії становила 50 млн клітин в 1 мл. Результати зчитували візуально.

Активність нітратредуктази, каталази і пероксидази мікобактерій визначали методом S. Virtanen [11], сукцинатдегідрогенази, глутаматдегідрогенази, глюкозодегідрогенази, алкогольдегідрогенази - методом З.Н. Попової [1].

Результати і їхнє обговорення

Мікобактерії вважаються облігатними аеробами, але у процесі інфекції вони перебувають в анаеробних умовах. Вивчення метаболічних шляхів мікобактерій дало змогу встановити наявність у них генів, гомологічних до анаеробної нітратредуктази, що дає мікобактеріям змогу існувати в анаеробних умовах. Їхня властивість адаптуватися до анаеробних умов пов'язана з активністю нітратредуктази – ферменту, що дозволяє у відсутності кисню нітратне дихання. Отже, нітратне дихання робить значний внесок у вірулентність і антибіотикорезистентність мікобактерій [10, 12].

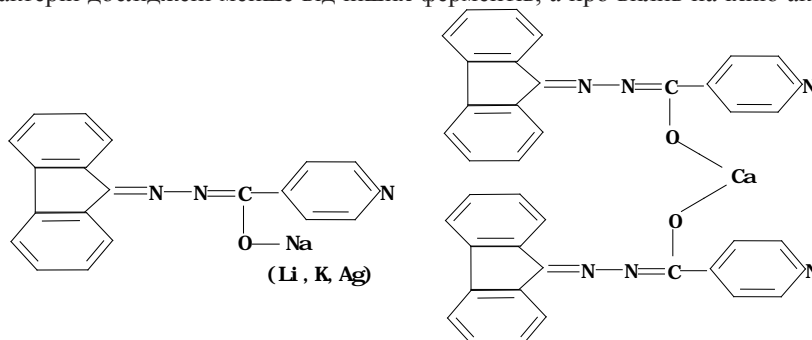
Відносно високий рівень стійкості мікобактерій до бактерицидної дії органічних пероксидів і пероксиду водню спричиняється мікобактеріальною каталазою та пероксидазою. При дії пероксидів навіть при мінімальній каталазній активності виживає 85% мікобактерій. Механізми регуляції генів синтезу каталази та пероксидази мікобактерій суттєво відрізняються від таких у інших бактерій. Пероксидазна активність строго корелює з резистентністю штамів мікобактерій до протитуберкульозних препаратів, а наявність високої активності каталази та пероксидази свідчить про стійкість штаму мікобактерій до ізоніазиду [4–7].

Фермент каталаза є у всіх видів мікобактерій, але при прогріванні культури до +68°C протягом 30 хв каталазна активність зникає у мікобактерій туберкульозу і зберігається у всіх атипових мікобактерій. Більшість штамів атипових мікобактерій характеризується високою каталазною активністю, яка набагато перевищує активність каталази мікобактерій туберкульозу. Відомо, що втрата патогенності мікобактерій перебуває у прямій залежності від втрати каталазної активності. Крім того, відсутність активності цього ферменту у мікобактерій може бути показником зниженої вірулентності.

Пероксидаза – фермент, що каталізує окиснювальні процеси у клітині. Лише строгі анаероби позбавлені цього ферменту. Мікобактерії туберкульозу мають значну пероксидазну активність. Вона залежить від рН середовища і при кислій реакції різко знижується.

Відомо, що визначення пероксидазної активності є більш чутливим тестом, ніж каталазної, для виявлення стійкості мікобактерій туберкульозу до ізоніазиду, адже всі штамми, що мали навіть мінімальний ступінь стійкості, виявлялися пероксидазонегативними.

Дегідрогенази присутні в кожній живій клітині, але їхня активність різна. Дегідрогенази мікобактерій досліджені менше від інших ферментів, а про вплив на їхню активність



Структурні формули натрієвої, літєвої, калійної, срібної та кальцієвої солей флуореніду.

антибактеріальних речовин є лише поодинокі роботи. Однак вони відіграють важливу роль у процесах метаболізму. Ці ферменти каталізують реакції окиснення різноманітних субстратів за рахунок від'єднання від їхніх молекул атома водню. Вивчення активності дегідрогеназ може бути вагомим аргументом при вивченні вірулентності різних мікобактерій. Дегідрогенази відіграють роль у проникненні клітин мікобактерій у клітини альвеолярного епітелію, спричиняють АТФ-індуковане руйнування клітин макрофагів. Некроз клітин легеневого епітелію, спричинений вірулентними мікобактеріями, пов'язаний з високою активністю дегідрогеназ. Відмінності у структурі та ферментативних властивостях дегідрогеназ могли б стати ключем у відкритті нових ліків проти патогенних мікобактерій [3, 8, 13].

Як видно з наведених даних (табл. 1), штам *M. tuberculosis* H₃₇Rv має позитивну нітратредуктазну, каталазну, пероксидазну, сукцинатдегідрогеназну, глутаматдегідрогеназну, глюкозодегідрогеназну, алкогольдегідрогеназну активність. Після дії всіх препаратів, які вивчалися, на досліджувані мікобактерії встановлено, що каталазна та пероксидазна активність у культурі *M. tuberculosis* H₃₇Rv не виявляється. Нітратредуктазна активність пригнічувалася у *M. tuberculosis* H₃₇Rv дією препаратів ЛІ-45 та ЛІ-72, сукцинатдегідрогеназна – флуренізидом, ЛІ-45, ЛІ-53, ЛІ-69. Глутаматдегідрогеназна, глюкозодегідрогеназна й алкогольдегідрогеназна активність стабільно зберігається під дією досліджуваних речовин у *M. tuberculosis* H₃₇Rv.

Таблиця 1

Активність ферментів у культурах мікобактерій *M. tuberculosis* H₃₇Rv після дії на них досліджуваних препаратів

Препарати	Ферменти						
	каталаза	пероксидаза	нітратредуктаза	сукцинатдегідрогеназа	глутаматдегідрогеназа	глюкозодегідрогеназа	алкогольдегідрогеназа
Контроль	+	+	+	+	+	+	+
Ізоніазид	-	-	+	+	+	+	+
Флуренізид	-	-	+	-	+	+	+
ЛІ-45	-	-	-	-	+	+	+
ЛІ-53	-	-	+	-	+	+	+
ЛІ-54	-	-	+	+	+	+	+
ЛІ-69	-	-	+	-	+	+	+
ЛІ-72	-	-	-	+	+	+	+

Примітки. 1. + – позитивна реакція; 2. – – відсутня реакція.

У *M. bovis* 8 нітратредуктазна, глутаматдегідрогеназна, глюкозодегідрогеназна й алкогольдегідрогеназна активність виявлена не була (табл. 2). Після дії всіх досліджуваних препаратів на мікобактерії редукція нітратів у них залишилася без змін, за винятком дії препаратів ЛІ-53, флуренізиду, ізоніазиду, яка спричиняла нітратредуктазну активність у дослідних зразках цих мікобактерій. Каталазна активність у штаму *M. bovis* 8 зберігалася під дією препарату ЛІ-72, пероксидазна – під дією препарату ЛІ-53. Сукцинатдегідрогеназна активність пригнічувалася ізоніазидом, ЛІ-45, ЛІ-69. Глутаматдегідрогеназна активність, не виявлена в контролі у *M. bovis* 8, з'являлась у цього штаму під дією ізоніазиду, ЛІ-69, алкогольдегідрогеназна – під дією ізоніазиду, ЛІ-53, ЛІ-72. Досліджувані препарати не впливають на зміну глюкозодегідрогеназної активності.

Штам атипичних мікобактерій *M. scrofulaceum* 526 проявляє позитивну реакцію на каталазу, сукцинатдегідрогеназу, глутаматдегідрогеназу, глюкозодегідрогеназу, алкогольдегідрогеназу активність (табл. 3). Активність нітратредуктази слабкопозитивна і після дії всіх досліджуваних препаратів на мікобактерії. На наявність каталазної активності *M. scrofulaceum* 526 впливу досліджуваних препаратів виявлено не було. У атипичних мікобактерій пероксидазна активність не виявлялася. На зміну пероксидазної активності *M. scrofulaceum* 526 вищеназвані речовини не впливають. Сукцинатдегідрогеназна активність пригнічувалася у *M. scrofulaceum* 526 всіма досліджуваними препаратами, глутаматдегідрогеназна – флуренізидом, ЛП-45, ЛП-69,

Таблиця 2

Активність ферментів у культурах мікобактерій *M. bovis* 8 після дії на них досліджуваних препаратів

Препарати	Ферменти						
	каталаза	пероксидаза	нітратредуктаза	сукцинатдегідрогеназа	глутаматдегідрогеназа	глюкозодегідрогеназа	алкогольдегідрогеназа
Контроль	+	+	-	+	-	-	-
Ізоніазид	+	+	+	-	+	-	+
Флуренізид	+	+	+	+	-	-	-
ЛП-45	-	-	-	-	-	-	-
ЛП-53	-	±	±	+	-	-	+
ЛП-54	-	-	-	+	-	-	-
ЛП-69	-	-	-	-	+	-	-
ЛП-72	+	-	-	+	-	-	+

Примітки: «+» – позитивна реакція; «±» – відсутня реакція.

Таблиця 3

Активність ферментів у культурах мікобактерій *M. scrofulaceum* 526 після дії на них досліджуваних препаратів

Препарати	Ферменти						
	каталаза	пероксидаза	нітратредуктаза	сукцинатдегідрогеназа	глутаматдегідрогеназа	глюкозодегідрогеназа	алкогольдегідрогеназа
Контроль	+	-	±	+	+	+	+
Ізоніазид	+	-	±	-	+	-	-
Флуренізид	+	-	±	-	-	-	-
Солі флуренізиду	+	-	±	-	-	-	-
ЛП-45	+	-	±	-	-	-	+
ЛП-53	+	-	±	-	+	-	-
ЛП-54	+	-	±	-	+	+	-
ЛП-69	+	-	±	-	-	+	+
ЛП-72	+	-	±	-	+	-	+

Примітки. «+» – позитивна реакція; «±» – слабкопозитивна реакція; «-» – відсутня реакція.

глюкозодегідрогеназна – ізоніазидом, флуренізидом, ЛІ-45, ЛІ-53, ЛІ-72, алкогольдегідрогеназна – ізоніазидом, флуренізидом, ЛІ-53, ЛІ-54.

Таким чином, у результаті проведених досліджень виявлено певні особливості у зміні ферментативної активності каталази, пероксидази, нітратредуктази та деяких дегідрогеназ мікобактерій при дії на них новосинтезованих речовин. Так, усі препарати пригнічують активність пероксидази у *M. scrofulaceum* 526, пероксидази та каталази у *M. tuberculosis* H₃₇Rv. Препарати ЛІ-45, ЛІ-54, ЛІ-69, ЛІ-72 пригнічують активність пероксидази, а ЛІ-45, ЛІ-53, ЛІ-54, ЛІ-69 – каталази у *M. bovis* 8. Впливу нових речовин на активність нітратредуктази у *M. scrofulaceum* 526 не виявлено. Вона пригнічується препаратами ЛІ-45, ЛІ-72 у *M. tuberculosis* H₃₇Rv, а під дією препаратів флуренізиду й ізоніазиду нітратредуктазна активність реєструвалась у штаму *M. bovis* 8.

Оскільки наявність каталазної активності розглядають в основному як показник патогенності мікобактерій, можна припустити, що дія вказаних препаратів приводить до зниження патогенності культур мікобактерій *M. tuberculosis* H₃₇Rv та *M. bovis* 8. У *M. scrofulaceum* 526 каталазна активність під впливом досліджуваних речовин не змінюється.

Дегідрогеназна активність найчастіше пригнічується у досліджуваних штамів мікобактерій під дією речовин ЛІ-45, ЛІ-53, ЛІ-54, флуренізиду. Найбільшу тенденцію до втрати активності дегідрогеназ виявлено у штаму *M. scrofulaceum* 526. У культурі *M. bovis* 8 з'являлась активність глутаматдегідрогенази й алкогольдегідрогенази після дії речовин ЛІ-53, ЛІ-69, ЛІ-72, ізоніазиду, можливо, за рахунок пошкодження ними клітинної стінки бактерій, що полегшує вихід ферментів за межі клітини.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Попова З. Н. Быстрый метод дифференциации S и R форм микроорганизмов по их сукцинатдегидрогеназной активности // Лаб. дело. 1963. № 2. С. 39–41.
2. Сидоренко Ю. В. Особливості ферментативної активності системи антиоксидантного захисту у хворих на вперше діагностований туберкульоз легень, викликаний полірезистентними штамми мікобактерій // Укр. мед. альманах. 2008. Т. 11. № 4. С. 140–142.
3. Aniszewski T. Succinate dehydrogenase and acid phosphatase activity in phaseolus lunatus testa // Acta Biol. Cracoviensia. 2006. Vol. 2. N 48. P. 59–65.
4. Bertrand T., Eady N., Jones J. et al. Crystal structure of Mycobacterium tuberculosis catalase-peroxidase // J. Biol. Chem. 2004. Vol. 37. N 279. P. 991–999.
5. Chauhan R., Mande S. Characterization of the Mycobacterium tuberculosis H₃₇Rv alkyl hydroperoxidase AhpC points to the importance of ionic interactions in oligomerization and activity // Biochem. J. 2001. Vol. 15. N 354. P. 209–215.
6. Chih-Jen W., Benfang L., James M., Shiao-Chun T. Isoniazid activation defects in recombinant Mycobacterium tuberculosis catalase-peroxidase (KatG) mutants evident in InhA inhibitor production // Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 2003. Vol. 47. N 2. P. 670–675.
7. Daffe M., Etienne G. The capsule of Mycobacterium tuberculosis and its implications for pathogenicity // Tuberc. Lung Dis. 1999. Vol. 3. N 79. P. 153–169.
8. Dobos K., Spotts E., Quinn F., King C. Necrosis of lung epithelial cells during infection with Mycobacterium tuberculosis is preceded by cell permeation // Infect. Immun. 2000. Vol. 11. N 68. P. 6300–6310.
9. Manca C., Paul S., Barry C. et al. Mycobacterium tuberculosis catalase and peroxidase activities and resistance to oxidative killing in human monocytes *in vitro* // Infect. Immun. 1999. Vol. 1. N 67. P. 74–79.
10. Mariani F., Cappelli G., Riccardi G., Colizzi V. Mycobacterium tuberculosis H₃₇Rv comparative gene-expression analysis in synthetic medium and human macrophage // Gene. 2000. Vol. 8. N 253. P. 281–291.

11. *Virtanen S.* Some simple methods of identifying nonphotochromogenic anonymous mycobacteria // *Ann. Med. Exptl. et Biol.* 1963. Vol. 41. N 4. P. 554–559.
12. *Weber I., Fritz C., Rutkowski S. et al.* Anaerobic nitrate reductase (narGHJI) activity of *Mycobacterium bovis* BCG in vitro and its contribution to virulence in immunodeficient mice // *Mol. Microbiol.* 2000. Vol. 5. N 35. P. 1017–1025.
13. *Zaborina O., Li X., Cheng G., Kapratl V., Chakrabarty A.* Secretion of ATP-utilizing enzymes, nucleoside diphosphate kinase and ATPase, by *Mycobacterium bovis* BCG: sequestration of ATP from macrophage P2Z receptors? // *Mol. Microbiol.* 1999. Vol. 5. N 31. P. 1333–1343.

Стаття: надійшла до редакції 28.02.11

доопрацьована 14.03.11

прийнята до друку 28.03.11

FEATURES CHANGES ENZYME ACTIVITY MYCOBACTERIA SALTS UNDER FLURENIZIDE

O. Zarichna

*Research Institute of Hygiene and Epidemiology Ministry
of Public Health of Ukraine
12, Zelena St., Lviv 79005, Ukraine
e-mail: ndi-labepid@i.ua*

The changes of activity of catalase, peroxidase, nitrate reductase, glutamate dehydrogenase, glucose dehydrogenase, alcohol dehydrogenase of mycobacterium tuberculosis *M. tuberculosis* H₃₇R_v, *M. bovis* 8 and atypical mycobacteria *M. scrofulaceum* 526, when exposed to flurenizide, isoniazide and 5 new substances that are salts of the antimicrobial drug flurenizide.

Key words: Mycobacterium tuberculosis, flurenizide salt, enzyme activity.

ОСОБЕННОСТИ ИЗМЕНЕНИЯ ФЕРМЕНТАТИВНОЙ АКТИВНОСТИ МИКОБАКТЕРИЙ ПОД ДЕЙСТВИЕМ СОЛЕЙ ФЛУРЕНИЗИДА

O. Зарічна

*Научно-исследовательский институт эпидемиологии и гигиены МОЗ
Украины
ул. Зеленая, 12, Львов 79005, Украина
e-mail: ndi-labepid@i.ua*

Изучены изменения активности каталазы, пероксидазы, нитратредуктазы, глутаматдегидрогеназы, глюкозодегидрогеназы, сукцинатдегидрогеназы, алкогольдегидрогеназы микобактерий туберкулеза *Mycobacterium tuberculosis* H₃₇R_v, *M. bovis* 8 и атипичных микобактерий *M. scrofulaceum* 526, после воздействия на них флуренизида, изониазида и 5 новых субстанций, которые являются солями отечественного противомикробного препарата флуренизида.

Ключевые слова: микобактерии туберкулеза, соли флуренизида, ферментативная активность.