

Бактерицидное действие лизоцима

В. М. ПОДБОРОНОВ¹, М. Ю. ЩЕЛКАНОВ⁵, И. П. СМЕРНОВА², Л. А. БУРЕНКОВА⁴,
В. П. НОВИКОВА³, В. А. АРИСТОВА⁵, Е. Л. НОВИКОВА³, Г. Г. МОСКВИТИНА¹, А. М. ИОФФЕ²

¹ ФГБУ «НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Н. Ф. Гамалеи» Минздрава России, Москва;

² Российский университет дружбы народов, Москва;

³ Карачаево-Черкесская государственная технологическая академия, Черкесск;

⁴ УРАМН «Институт полиомиелита и вирусных энцефалитов им. М. П. Чумакова» Российской академии медицинских наук, Московская обл.;

⁵ ФГБУ «Институт вирусологии им. Д. И. Ивановского» Минздрава России, Москва

Bactericidal Effect of Lysozyme

V. M. PODBORONOV, M. YU. SHCHELKANOV, I. P. SMIRNOVA, L. A. BURENKOVA,
V. P. NOVIKOVA, V. A. ARISTOVA, E. L. NOVIKOVA, G. G. MOSKVITINA, A. M. IOFFE

N. F. Gamaleya Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Moscow

Russian Peoples' Friendship University, Moscow

Karachaevo-Cherkesk State Technological Academy, Cherkessk

M. P. Chumakov Institute of Poliomyelitis and Virus Encephalitis, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow region

D. I. Ivanovsky Institute of Virology, Moscow

Описано выделение лизоцима из гемолимфы иксодоидных клещей *Alveonatus lahorensis* (Acari: Parasitiformes, Argasidae) и *Hyalomma marginatum* (Acari: Parasitiformes, Ixodidae) с помощью воздействия ультразвуком. Установлено, что бактерицидный эффект в отношении *Staphylococcus aureus* и *Micrococcus luteus* лизоцима, выделенного с помощью ультразвука, существенно превосходит таковой яичного лизоцима и лизоцима из гемолимфы клещей, полученного без воздействия ультразвуком. Разрушение клеток гемолимфы приводит к достоверному увеличению продукции лизоцима.

Ключевые слова: лизоцим, *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus*, *Hyalomma marginatum*, *Alveonatus lahorensis*, бактерицидный эффект, гемолимфа.

Isolation of lysozyme from hemolymph of *Alveonatus lahorensis* (Acari: Parasitiformes, Argasidae) and *Hyalomma marginatum* (Acari: Parasitiformes, Ixodidae) with using ultrasound is described. It was shown that the bactericidal effect of the ultrasound-extracted lysozyme against *Staphylococcus aureus* and *Micrococcus luteus* significantly exceeded that of the chicken egg lysozyme and lysozyme from ticks without ultrasound exposure. Disintegration of the hemolymph cells increased lysozyme production.

Key words: lysozyme, *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus*, *Hyalomma marginatum*, *Alveonatus lahorensis*, bactericidal effect, hemolymph.

Прошло уже более века с 1901 г., когда И. И. Мечников дал определение иммунитета как «общей системы явлений, благодаря которым организм может выдержать нападение болезнетворных микробов». За это время огромный прогресс достигнут в изучении механизмов иммунитета позвоночных животных. Однако лишь в последние 10–20 лет стали активно изучаться механизмы иммунитета членистоногих.

Одним из наиболее интересных объектов антимикробного иммунитета членистоногих является лизоцим, который встречается как у беспозвоночных, так и позвоночных [1–4].

У позвоночных животных лизоцим синтезируется, в основном, в клетках, способных к фаго-

цитозу, — гранулоцитах и макрофагах. В норме в перитонеальной жидкости присутствуют макрофаги, мезотелиальные клетки, небольшое количество лимфоцитов, эозинофиллы, при воспалении — полиморфно-ядерные клетки. Что касается беспозвоночных, то было показано, что фагоцитарной активностью обладают ранние и зрелые плазматочиты. По морфологическим признакам макрофаги могут быть отнесены к гемато- или плазматочитам. При заражении клещей бактериями в гемолимфе увеличивается число макрофагов и обнаруживаются клетки с фагоцитированными бактериями [3]. Вместе с тем в литературе отсутствуют данные по продукции лизоцима форменными клетками гемолимфы у беспозвоночных животных.

Целью настоящей работы явилось изучение продукции лизоцима клетками гемолимфы иксодоидных клещей и его бактерицидного действия.

© Коллектив авторов, 2013

Адрес для корреспонденции: 123098 Москва, ул. Гамалеи, 18. НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Н. Ф. Гамалеи

Диаметр зоны подавления роста (в мм) микроорганизмов под действием лизоцима гемолимфы

Вариант опыта (n=10)	Микроорганизм	Обработка УЗ	Без обработки УЗ	Яичный лизоцим	Физиологический раствор
Гемолимфа клещей <i>Alveonassus lahorensis</i>	<i>Micrococcus luteus</i> ATSS-4698	29,0±1,5	21,4±1,7	20,5±1,2	—
Гемолимфа клещей <i>Alveonassus lahorensis</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	26,0±1,3	15,4±1,2	20,4±1,4	—
Гемолимфа клещей <i>Hyalomma marginatum</i>	<i>Micrococcus luteus</i> ATSS-4698	19,4±1,7	15,0±0,5	20,4±1,0	—
Гемолимфы клещей <i>Hyalomma marginatum</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	19,4±1,1	15,1±0,4	20,4±1,0	—

Примечание. Итоговые значения приводятся в форме: среднее значение среднеквадратическое отклонение; «—» — отсутствие подавления роста культуры микроорганизмов.

Материал и методы

Иксодидные клещи — *Alveonassus lahorensis* Neumann, 1908 (*Acari: Parasitiformes, Argasidae*) и *Hyalomma marginatum* (*Acari: Parasitiformes, Ixodidae*) Koch, 1844 — использовались для получения гемолимфы, которую брали из лапки клеща.

Подготовка образцов. Гемолимфу иксодидных клещей вносили в пробирку с 0,85% физиологическим раствором и подвергали воздействию ультразвуком на аппарате MSE (Англия) при максимальной мощности (10 с × 3 повтора) при 4°C, центрифугировали при 5000 об/мин в течение 5 мин для удаления нерастворимого материала в соответствии с ранее описанной методикой [5].

Изучение бактерицидного действия образцов. Диски толстой фильтровальной бумаги, смоченные исследуемым образцом, помещали на мясо-пептонные агаровые газоны *Staphylococcus aureus* или *Micrococcus luteus* ATSS-4698. В качестве контролей использовали яичный лизоцим в концентрации 0,15 мг/мл, а также гемолимфу клещей без воздействия ультразвуком и физиологический раствор. Учёты размеров зон подавления роста стафилококков и микрококков проводили через 1–2 сут с повторной проверкой через 3–5 сут. О результатах антибактериального действия судили по максимальному диаметру зоны подавления роста бактерий. Положительный результат регистрировали при образовании зоны подавления роста культуры диаметром от 15–25 мм и более.

Результаты и обсуждение

Во всех проведённых экспериментах лизоцим гемолимфы *A.lahorensis* обладал большей бактерицидной активностью после обработки ультразвуком (таблица). Для средних значений по отношению к *M.luteus* и *S.aureus* превышение достоверно с вероятностью альтернативной гипотезы (здесь и далее, использован критерий Стьюдента) $p < 0,00005$ (достоверным считается уровень $p < 0,05$). Обработанный ультразвуком лизоцим гемолимфы *A.lahorensis* со столь же надёжной достоверностью превышал бактерицидную активность и яичного альбумина в отношении обоих использованных микроорганизмов. При этом необработанный ультразвуком лизоцим гемолимфы *A.lahorensis* по сравнению с яичным альбумином был достоверно ($p < 0,00005$) менее активен в отношении *S.aureus* и недостоверно ($p < 0,3$) несколько более активен (в 1,04 раза) в отношении *M.luteus*.

Аналогичным образом, во всех проведённых экспериментах, обработка ультразвуком лизоцима гемолимфы *H.marginatum* достоверно ($p < 0,00005$) повышала его бактерицидную активность. При этом яичный лизоцим имел более высокую активность даже по сравнению с обрабо-

танным ультразвуком лизоцимом гемолимфы этого вида клещей как по отношению *M.luteus*, так и *S.aureus*, хотя и недостоверную ($p < 0,2$ и $p < 0,06$, соответственно). Вместе с тем разница в активности необработанного ультразвуком лизоцима гемолимфы и яичного альбумина была вполне достоверна (в обоих случаях, $p < 0,00005$).

Следует отметить широту активности клещевых лизоцимов — в отношении и микрококков, и стафилококков.

Использованные режимы ультразвуковой обработки приводили к разрушению клеток гемолимфы, что верифицировалось с помощью прямого микрокопирования. По-видимому, это и стало причиной достоверного увеличения выхода лизоцима. При этом выявленные различия в антибактериальном действии гемолимфы у использованных видов иксодидных клещей объясняются различиями аминокислотного состава, как было выявлено нами ранее [6]. В наших предыдущих исследованиях был выделен лизоцим из различных видов клещей и изучены его физико-химические и антибактериальные свойства [3]. Сравнение аминокислотных составов клещевых и яичных лизоцимов указывает на их принадлежность к одной группе ферментов. Эти белки имеют одинаковый набор аминокислотных остатков, хотя по содержанию отдельных аминокислот несколько различаются [6]. Эти исследования значительно позже подтвердились зарубежными авторами [7], когда возник чисто прикладной интерес к переносчикам и непереносчикам боррелий — возбудителей болезни Лайма. Действительно, в кишечнике кровососов были обнаружены специфические белки — дефенсины, у клещей их называли варизинами [8]. Их появление имеет место как у голодных клещей рода *Ornithodoros* [9], так и в особенности под влиянием бактериального раздражения, например *S.aureus*. По аминокислотному составу они весьма близки аналогичным белкам стрекоз и скорпионов, а гены, ответственные за их появление, имеются в клетках средней кишки, жировом теле и репродуктивных органах [9, 10]. Важно отметить, что именно благодаря дефенсинам происходит лизис грамположительных боррелий *Borrelia burgdorferi* в гемолимфе клещей *Dermacentor variabilis*, в

кишечнике которых также находят боррелий [11–13]. Напротив, в гемолимфе специфического переносчика *Ixodes scapularis* этого не происходит [12].

ЛИТЕРАТУРА

1. Ермольева З. В. Лизоцим. Антибиотики, интерферон, бактериальные полисахариды. М.: 1968; 382.
2. Бухарин О. В., Васильев Н. В., Усвяцев Б. Я. Лизоцим микроорганизмов. Томск: 1985; 213.
3. Подборонов В. М., Подборонов А. М. Лизоцим и другие антибактериальные факторы паразитических членистоногих их действие на патогенные микроорганизмы. М.: Нефть и газ 1993; 291.
4. Подборонов В. М. Бактерии сальмонеллы и сальмонеллезы. Пенза: 2012; 118.
5. Подборонов В. М., Смирнова И. П., Подборонов А. М. Сравнительное изучение биохимических свойств кровососущих клещей различных семейств, родов и видов методом электрофореза. Сибирь-Восток 2006; 1: 28–31.
6. Подборонов В. М. Возбудители болезней человека, животных и клещи. М.: 2004; 224.
7. Kopacek P., Vogt L., Jindrak L., Safarik I. Purification and characterization of the lysozyme from the gut of the soft tick *Ornithodoros moubata*. Insect Biochem Mol Biol 1999; 29: 989–997.
8. Sonenshine D. E., Ceraul S. M., Hynes W. E. et al. Expression of defensin-like peptides in tick hemolymph and midgut in response to challenge with *Borrelia burgdorferi*, *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. Exp Appl Acarol 2002; 28: 1: 127–134.
9. Nakajima Y., Ogihara K., Taylor D., Yamakawa M. Antibacterial hemoglobin fragments from the midgut of the soft tick, *Ornithodoros moubata* (Acari: Argasidae). J Med Entomol 2003; 40: 1: 78–81.
10. Nakajima Y., vander Goes van Naters-Yasui A., Taylor D., Yamakawa M. Two isoforms of a member of the arthropod defensin family from the soft tick *Ornithodoros moubata* (Acari: Argasidae). Insect Biochem Mol Biol 2001; 31: 747–751.
11. Johns R., Sonenshine D. E., Hynes W. L. Response of the tick *Dermacentor variabilis* (Acari: Ixodidae) to honocoelic inoculation of *Borrelia burgdorferi* (Spirochetales). J Entomol 2000; 2: 265–270.
12. Johns R., Ohnishi J., Broadwater A. et al. Contrasts in tick innate immune responses to *Borrelia burgdorferi* challenge; immunotolerance in *Ixodes scapularis* versus immunocompetence in *Dermacentor variabilis* (Acari: Ixodidae). J Med Entomol 2001; 38: 1: 99–107.
13. Johns R., Sonenshine D. E., Hynes W. L. Identification of a defensin from the hemolymph of the American dog tick, *Dermacentor variabilis*. Insect Biochem Mol Biol 2001; 31: 657–665.

Описанные закономерности могут иметь определенное практическое значение в случае паразитарного накопления лизоцима для медицинских или ветеринарных нужд.