

МИКРОБИОЛОГИЯ

ИЗУЧЕНИЕ ФЕРМЕНТА ЛИТИКАЗЫ КАК НОВОГО АНТИМИКОТИЧЕСКОГО ПРЕПАРАТА

Н.П. Сачивкина, Э.Г. Кравцов, Е.А. Васильева

Кафедра микробиологии
Российский университет дружбы народов
ул. Миклухо-Маклая, 8, Москва, Россия, 117198

В статье приведены результаты лабораторного исследования коммерческого препарата Lyticase как нового антимикотического средства. В ходе исследования выяснилось, что данный препарат снижает оптическую плотность тест-культуры *Candida albicans* до 53%, тормозит адгезию гриба на эпителиоцитах влагалища здоровой женщины стимулирует трубкообразование кандид и делает их более доступными для фагоцитоза.

Микозы — широкораспространенная группа инфекций животных и человека, вызванных большим числом видов (более 200) различных патогенных и условно-патогенных грибов. Проблема микозов на сегодняшний день стоит достаточно остро, и, несмотря на значительный прогресс в области противогрибковой терапии, лечение микозов до сих пор остается нерешенной проблемой. Истинно безопасное и эффективное антимикотическое средство до сих пор не создано, а в практике сохраняет свои позиции комбинированная антибиотикотерапия.

Литиказа (Lyticase) — фермент, продуцируемый *Micrococcus luteus*, достаточно давно используется в научных целях как реагент, разрушающий клеточную стенку гриба [2]. Обработанная им клетка превращается в сферопласт, чувствительный к изменению осмотического давления, в результате чего его жизнеспособность ограничена. Получение грибов в форме сферопластов является необходимой манипуляцией в генной инженерии, в связи с чем потребность в получении литиказы в промышленных масштабах достаточно высока. Многие фирмы выпускают этот фермент, используя не только природные продуценты, но и рекомбинантные штаммы *E. coli* [1; 4].

Вопрос о возможности применения литиказы в лечебных целях остается открытым. Для ответа на этот вопрос необходимо решение комплекса задач, включающего выяснение влияния фермента на основные факторы патогенности гриба.

В настоящей работе мы изучали влияние обработки литиказой на культуру грибов *Candida albicans*, их жизнеспособность, активность адгезии на вагинальном эпителии, морфогенез, способность фагоцитироваться макрофагами.

Материалы и методы. В качестве объекта был использован клинический изолят *Candida albicans* от беременной женщины с проявлениями кандидозного вагинита.

Идентификацию его проводили по росту на хромогенной среде и путем тестирования в системе API. Обработку суточной культуры гриба осуществляли литиказой фирмы Difco с исходной удельной активностью 20 000 Ед/мг.

Литическое действие фермента определяли по величине снижения оптической плотности суспензии грибов после воздействия на них фермента в течение часа [2]. Эффект выражали в % относительно оптической плотности взвеси грибов, не подвергшихся обработке ферментом. Их жизнеспособность после обработки литиказой определяли по высеву на плотную среду Сабуро и подсчетом колоний относительно контроля (число *Candida albicans* до обработки литиказой).

Начальным этапом колонизации *Candida albicans* является адгезия, которая реализуется через разнообразные механизмы распознавания патогеном (грибом) тканей хозяина. Адгезины — участки поверхности кандид, участвующие в прикреплении последних к клеткам хозяина (эпителиоцитам влагалища, ЭВ). Прикрепление кандид к ЭВ инициирует колонизацию и инфекционный процесс [3]. Эта концепция легла в основу идеи предотвратить развитие инфекции путем блокады адгезии кандид к тканям хозяина. Изменение способности *Candida albicans* адгезироваться на вагинальном эпителии после воздействия на них литиказой определяли, сравнивая % эпителиоцитов, на которых произошла адгезия, в опыте и контроле (обработанные и необработанные литиказой грибы). Другим показателем адгезивной активности было число кандид на одном эпителиоците.

Влияние литиказы на морфогенез *Candida albicans* изучали по индукции трубнообразования. С этой целью обработанная (опыт) и необработанная литиказой (контроль) взвесь *Candida albicans*, отмытая от среды культивирования, переносилась в среду 199. Через 30 и 90 минут инкубирования при постоянном встряхивании делали мазки, в которых подсчитывали % клеток с герментативными трубками.

Для выявления влияния литиказы на способность фагоцитироваться суточную культуру грибов отмывали, ресуспендировали в забуференном физрастворе рН 7,2, доводили до концентрации 106 клеток/мл. В 1 мл взвеси вносили равный объем литиказы в концентрации 200 мкг/мл (опыт), в другую пробирку к 1 мл взвеси добавляли физиологический раствор. Макрофаги выделяли из асцитной жидкости, полученной после предварительного введения мышам в брюшную полость 3 мл стерильного мясопептонного бульона [5]. Клетки осаждали центрифугированием при 1000 оборотов/мин в течение 10 минут. Надосадочную жидкость удаляли, а находящиеся в осадке макрофаги ресуспендировали в среде 199 дважды, каждый раз повторяя процедуру «мягкого» центрифугирования. После последнего центрифугирования пипеткой отсасывали надосадочную жид-

кость, оставив в центрифужной пробирке 0,2 мл клеточной взвеси в среде 199. Затем в пробирку, содержащую 0,2 мл взвеси макрофагов, вносили 0,3 мл взвеси *Candida albicans* и 0,15 мл бычьей сыворотки. Перемешивали компоненты и термостатировали полученную смесь 30 мин при 37°C. По истечении указанного времени в пробирку добавляли 5 мл изотонического раствора натрия хлорида, встряхивали и центрифугировали 10 мин при 1500 об/мин. По окончании центрифугирования отобранного образца надосадочную жидкость удаляли и делали мазки, оставшуюся взвесь вновь помещали в термостат при 37 °С для продолжения инкубации еще в течение 90 мин (суммарное время инкубации 120 мин). Затем мазки готовили из осадка двухчасовой (120-минутной) инкубации. Приготовленные мазки фиксировали и окрашивали метиленовым синим. В препаратах подсчитывали не менее 100 клеток (общее число макрофагов). Определяли число фагоцитирующих клеток и общее число грибов на поверхности фагоцита. Через 120 минут отбирали пробы для посева. Учет проводили по количеству колоний *Candida albicans* до и после экспозиции культуры грибов с макрофагами.

Полученные в процессе работы цифровые показатели анализировали биометрически с использованием критериев Стьюдента и константного метода, а также обрабатывали методами вариационной статистики с использованием программы «Advanced Grapher Version 2.11».

Результаты и обсуждение. При обработке суспензии грибов *Candida albicans* литиказой наблюдалось снижение оптической плотности взвеси до 53% относительно контроля в течении 1 часа. Этот эффект зависел от дозы фермента, использованного в опыте (рис. 1). Эта зависимость может быть описана уравнением:

$$Y(x) = 10,6709591 \times \ln(x) - 9,1474414$$

при стандартном отклонении 5,1281655 и $R = 0,9066977$, где Y — величина снижения оптической плотности взвеси грибов после обработки литиказой относительно контроля, x — концентрация литиказы, использованной для обработки грибов (удельная активность фермента 20 000 ЕД/мг).

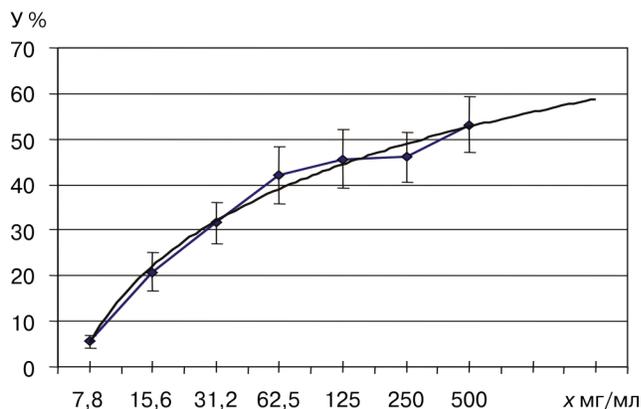


Рис. 1. Лизирующее действие литиказы на *Candida albicans*

Из этого следует, что введение литиказы вызывает повреждение клеточной стенки и лизис дрожжевых клеток. В какой степени повреждение влияет на жизнеспособность популяции грибов, было выяснено в том же опыте по высеваемости на среду Сабуро. Оказалось, что зависимость снижения числа жизнеспособных дрожжевых клеток после обработки их ферментом сходна со снижением оптической плотности взвеси (рис. 2) и описывается подобным уравнением:

$$Y(x) = 11,7929292 \times \ln(x) - 29,9004904$$

при стандартном отклонении 5,9455393 и $R = 0,898268$, где Y — снижение жизнеспособности взвеси грибов при высеве на чашки после обработки литиказой относительно контроля, x — доза литиказы.

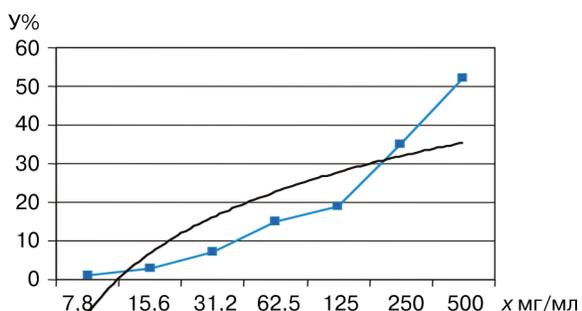


Рис. 2. Лизирующее действие литиказы на жизнеспособность *Candida albicans*

Оставалось неясным, в какой степени литиказа могла изменить свойства грибов, сохранивших жизнеспособность. Была сделана попытка выяснить, повлияло ли действие фермента на морфогенез *Candida albicans*. Путем посева на среду 199 обработанных и необработанных грибов мы индуцировали у них переход дрожжевой формы в мицелиальную. В препаратах, сделанных через 30 и 90 минут инкубации, % клеток, образующих трубки, в случае обработки литиказой, был значительно выше. В среднем, при трехкратном повторе опыта, разница в количестве трубкообразующих клеток, обработанных ферментом, и необработанных через 30 минут была в 5,1, а через 90 — в 4,8 раз больше (рис. 3).



Рис. 3. Переход дрожжевой формы в мицелиальную у *Candida albicans*

Известно, что поверхностный маннопротеиновый комплекс принимает участие в адгезии гриба к клеткам-мишеням, тем самым является ключевым фактором колонизации. Можно предположить, что разрушение этого комплекса может снижать адгезивные свойства культуры *Candida albicans*. С целью выяснения такого предположения была определена способность *Candida albicans* адгезироваться до и после обработки литиказой на вагинальном эпителии [3]. Адгезию грибов проводили на вагинальном эпителии здоровой женщины, полученном на 14 день менструального цикла (рис. 4). Среднее значение адгезивного индекса грибов (число микроорганизмов на одном эпителиоците), не обработанных ферментом, составил $4,2 \pm 0,4$ и был существенно ниже этого показателя при обработке грибов литиказой. При этом эффект понижения адгезии зависел от дозы фермента. На рис. 5 показано уменьшение индекса адгезии культуры *Candida albicans* на вагинальном эпителии в зависимости от дозы литиказы, использованной для ее обработки. Кривая регрессии может быть описана уравнением:

$$Y(x) = -0,3618888 \times \ln(x) + 3,6518707$$

при стандартном отклонении 0,3303268 и $R = 0,8317598$, где Y — индекс адгезии (ИА), число адгезированных грибов на 1 эпителиальную клетку, x — доза литиказы.



Рис. 4. Адгезия *Candida albicans* на вагинальном эпителии здоровой женщины

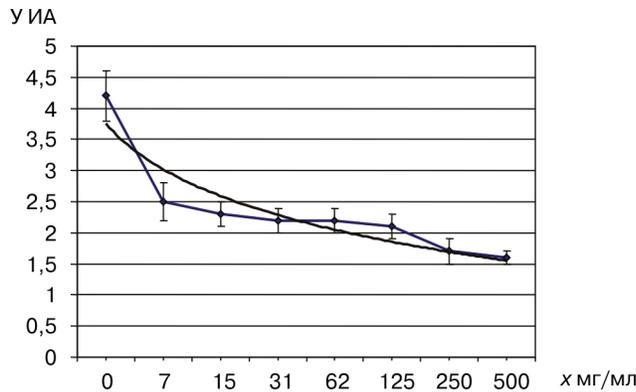


Рис. 5. Влияние литиказы на адгезивную активность *Candida albicans*

Из приведенных данных следует, что выраженный эффект снижения адгезивных свойств культуры *Candida albicans* может быть выявлен при обработке ее литиказой уже в концентрации 7 мг/мл.

Как было показано, воздействие литиказы частично лизирует культуру, а оставшиеся клетки теряют свою жизнеспособность. Это явилось основанием для постановки вопроса о возможности оставшихся после воздействия литиказой жизнеспособных грибов элиминироваться путем фагоцитоза. Было проведено сравнение фагоцитирования перитониальными макрофагами грибов, обработанных литиказой (опыт) и необработанных этим ферментом (контроль).

При определении фагоцитарного числа (% макрофагов, участвующих в захвате грибов) через 30 минут в контроле было выявлено $47 \pm 0,7\%$ фагоцитов с захваченными клетками грибов, при этом фагоцитарный индекс (число грибов на 1 фагоцитирующий макрофаг) составил $1,8 \pm 0,16$. В опыте, где в качестве фагоцитируемого объекта были использованы грибы, обработанные литиказой, эти показатели были существенно выше: фагоцитарное число составило $79 \pm 0,4\%$, а индекс — $2,7 \pm 0,18$. Выявленная закономерность не изменилась и при 90 минутной экспозиции — в контроле $\PhiЧ = 48 \pm 0,7\%$, а $\PhiИ = 1,69 \pm 0,13$, а в опыте — $66 \pm 0,6\%$ и $2,71 \pm 0,22$ соответственно. Завершенность фагоцитоза определяли по уменьшению жизнеспособных клеток грибов после их контакта с макрофагами в течение 120 минут. Установлено, что количество грибов, необработанных литиказой после фагоцитирования, снижается в $1,6 \pm 0,04$ раза, а обработанных — в $2,0 \pm 0,07$ раз. Это позволяет заключить, что обработка культуры *Candida albicans* литиказой делает ее более доступной для фагоцитоза, при этом активируется как прилипание грибов, так и их переваривание в фагоцитах.

Проведенные исследования позволяют предположить, что терапевтический эффект литиказы может быть обусловлен лизисом гриба, как результат разрушения его клеточной стенки. Неполная деградация манана сопровождается снижением жизнеспособности, уменьшением адгезии *Candida albicans* на эпителии. Возбудитель в этой ситуации оказывается более уязвимым к фагоцитарной атаке макроорганизма. В то же время нами было установлено, что грибы, подвергшиеся действию фермента, более легко переходят в мицелиальную форму. В какой степени этот феномен может повлиять на терапевтическое действие препарата, предполагается решать на экспериментальной мышинной модели кандидозной инфекции.

ЛИТЕРАТУРА

- [1] Jun Cheng, Lin Wang. Screening of augments of liver regeneration-binding proteins by yeast-two hybrid technique // HBPД Int. — 2003. — 2. — P. 81—84.
- [2] Scott J.H., Schekman R. Lyticase: Endoglucanase and Protease Activities That Act Together in Yeast Cell Lysis // J Bacteriol. — 1980. — May, 142(2). — P. 414—423.
- [3] Segal E., Soroka A., Lehrer N. Attachment of *Candida* to mammalian tissues-clinical and experimental studies // Zentralbl Bakteriол Mikrobiол Hyg [A]. — 1984. — Jul. — 257(2). — P. 257—265.

- [4] *Struhl K., Dan T., Scherer St.* High-Frequency Transformation of Yeast: Autonomous Replication of Hybrid DNA Molecules // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* — 1979. — Vol. 76. — № 3 (Mar.). — P. 1035—1039.
- [5] Способ определения фагоцитарной активности нейтрофилов периферической крови живых организмов. — Описание изобретения к патенту РФ. — Регистрационный номер заявки 2003107776/15 от 12.04.1998.

LITICASE'S STUDY AS A NEW ANTIMICOTIC MEANS

N.P. Sachivkina, E.G. Kravtsov, E.A. Wasileva

Department of Microbiology
Russian People's Friendship University
Miklucho-Maklay str., 8, Moscow, Russia, 117198

There are some results of laboratory research of commercial preparation Lyticase, as new antimicotic means in the article. During research it was found out that the given preparation reduces optical density of test culture *Candida albicans* to 53%; brakes adhesion of a mushroom on vaginal epithelial cells of the healthy woman; stimulates candidal tubes constitution and does their more accessible for phagocytosis.