

2. Дмитриева Н.Ф., Трофимов Д.Ю., Ещина А.С., Ряпис Л.А., Скоркина Ю.А., Герасимов А.Н., Журавлев М.В., Брико Н.И. Частота встречаемости генов *spe ABC* в штаммах *Streptococcus pyogenes* и идентификация возбудителя с помощью ПЦР. Журн микробиол. 2002, 5: 3-6.
3. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Д. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование. М., Мир, 1984.
4. Покровский В.И., Брико Н.И., Ряпис Л.А. Стрептококки и стрептококкозы. М., ГЭОТАР-Медиа, 2006.
5. Ряпис Л.А., Брико Н.И., Ещина А.С., Дмитриева Н.Ф. Стрептококки: общая характеристика и методы лабораторной диагностики. М., Идеал-Пресс, 2009.
6. Bessen D.E., McShan W.M., Nguyenet S.V. et al. Molecular epidemiology and genomics of group A *Streptococcus*. *Infect. Genet. Evol.* 2015, 33: 393-418.
7. Carapetis J.R., Steer A.C., Mulholland E.K. et al. The current evidence for the burden of group A streptococcal diseases. *Lancet Infect. Dis.* 2005, 5 (11): 685-694.
8. Cole J.N., Barnett T.C., Nizet V. et al. Molecular insight into invasive group A streptococcal disease. *Nature Rev. Microbiol.* 2011, 9: 724-736.
9. Dale J.B., Penfound T.A., Chiang E.Y. et al. New 30-valent M protein-based vaccine evokes cross-opsonic antibodies against nonvaccine serotypes of group A streptococci. *Vaccine.* 2011, 29: 8175-8178.
10. Fittipaldi N., Olsen R.J., Beres S.B. et al. Genomic analysis of emm59 group A *Streptococcus* invasive strains, United States. *EID J.* 2012, 4: 18.
11. O'Loughlin R.E., Roberson A., Cieslak P.R. et al. The epidemiology of invasive group A streptococcal infection and potential vaccine implications: United States, 2000-2004. *Clin. Infect. Dis.* 2007, 45: 853-862.
12. Sanderson-Smith M., De Oliveira D.M., Guglielmini J. et al. A systematic and functional classification of *Streptococcus pyogenes* that serves as a new tool for molecular typing and vaccine development. *J. Infect. Dis.* 2014, 210 (8): 1325-1338.
13. Swedo S.E., Leonard H.L., Garvey M. et al. Pediatric autoimmune neuropsychiatric disorders associated with streptococcal infections: clinical description of the first 50 cases. *Am. J. Psychiatry.* 1998, 155: 264-271.
14. Williamson D.A., Smeesters P.R., Steer A.C. et al. Comparative M-protein analysis of *Streptococcus pyogenes* from pharyngitis and skin infections in New Zealand: Implications for vaccine development. *BMC Infectious Diseases.* 2016, 16: 561.
15. Yaddanapudi K., Hornig M., Serge R. et al. Passive transfer of streptococcus induced antibodies reproduces behavioral disturbances in a mouse model of pediatric autoimmune neuropsychiatric disorders associated with streptococcal infection. *Mol. Psychiatry.* 2010, 15: 712-726.

Поступила 03.02.17

Контактная информация: Глушкова Екатерина Владимировна,
119991, Москва, ул. Трубецкая, 8, стр. 2, р.т.(499)248-69-28

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2017

*С.Б.Чекнев, Е.И.Вострова, М.А.Сарычева,
С.В.Кисиль, В.В.Анисимов, А.В.Востров*

ТОРМОЖЕНИЕ РОСТА БАКТЕРИЙ В КУЛЬТУРАХ *STREPTOCOCCUS PYOGENES* И *STREPTOCOCCUS AGALACTIAE* В ПРИСУТСТВИИ КАТИОНОВ МЕДИ И ЦИНКА

Федеральный научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф.Гамалеи, Москва

Цель. Оценка антибактериального действия миллимолярных концентраций катионов меди и цинка, примененных в виде сульфатов или хлоридов, в культурах *S.pyogenes* и *S.agalactiae*. *Материалы и методы.* Суспензию бактерий *S.pyogenes* или *S.agalactiae*, содержащую 10^8 КОЕ/мл, засеивали газоном на чашки Петри с глюкозо-сывороточным питательным агаром. Спустя 30 мин на поверхность газона с помощью 36-канального

штампа-репликатора каплями объемом по 5 мкл наносили солевые растворы меди или цинка с концентрацией по катионам металлов от 5×10^{-3} М до 5×10^{-1} М. Затем чашки с культурой бактерий инкубировали в течение суток при 37°C , после чего определяли диаметр зоны задержки роста бактерий. Для оценки наличия (отсутствия) жизнеспособных бактерий в зонах задержки роста из центра зоны производили посеvy материала в пробирки с глюкозо-сывороточным питательным бульоном, которые термостатировали в течение срока до 5 суток при 37°C , после чего оценивали прозрачность питательного бульона. *Результаты.* В диапазоне концентраций металлов от 500 мМ ингибирующее действие сульфата цинка в отношении бактерий *S.pyogenes* в 1.5 — 1.7 раза ($p < 0.001$) превосходит эффекты сульфата меди. При концентрациях катионов 100 и 500 мМ действие хлорида цинка в 1.2 — 1.3 раза ($p < 0.05 - 0,1$) превосходит эффекты хлорида меди. Посевы материала из зон задержки роста культуры *S.pyogenes*, обработанных солями меди, в 67 — 85% случаев, а обработанных солями цинка в 30% наблюдений обнаруживают соответствующую контрольной прозрачность питательного бульона. В культуре *S.agalactiae* при концентрациях металла 100 и 500 мМ хлорид меди реализует на 8 — 13% ($p > 0.1$) более выраженное антибактериальное действие, чем хлорид цинка. Посевы материала из зон задержки роста культуры *S.agalactiae*, обработанных солями меди, в 48 — 67% наблюдений обнаруживают соответствующую контрольной прозрачность питательного бульона. *Заключение.* В миллимолярных концентрациях катионы меди и цинка обладают выраженным антибактериальным действием в культурах *S.pyogenes* и *S.agalactiae*. Бактерии *S.pyogenes* проявляют более высокую, чем *S.agalactiae*, чувствительность к действию катионов меди и цинка, оцениваемому по зонам задержки роста. В отличие от *S.agalactiae*, они в значительной части наблюдений подвержены бактерицидному воздействию катионов цинка.

Журн. микробиол., 2017, № 3, С. 26—35

Ключевые слова: антибактериальное действие, медь, цинк, *S.pyogenes*, *S.agalactiae*

*S.B.Cheknev, E.I.Vostrova, M.A.Sarycheva,
S.V.Kisil, V.V.Anisimov, A.V.Vostrov*

INHIBITION OF THE BACTERIAL GROWTH IN THE CULTURES OF *STREPTOCOCCUS PYOGENES* AND *STREPTOCOCCUS AGALACTIAE* IN PRESENCE OF COPPER AND ZINC IONS

Gamaleya Federal Research Center of Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia

Aim. The work was performed with the purpose to study antibacterial action of millimolar concentrations of copper and zinc ions, used as sulfates or chlorides in the cultures of *S.pyogenes* and *S.agalactiae*. *Materials and methods.* Suspensions of the *S.pyogenes* and *S.agalactiae* bacteria which contained 10^8 CFU/ml were sown by the lawns into the standard Petri dishes coated with the supplemented Nutrient Agar. 30 min later the salt solutions of copper or zinc were added by the 5 μ l drops on the surfaces of the lawns with use of 36-channel stamp replicator. The salt solutions contained copper or zinc at the concentrations ranged between 5×10^{-3} М to 5×10^{-1} М of the metals. Then the dishes containing bacterial cultures were incubated for 24 hrs at 37°C followed by measuring diameter of the area of culture growth inhibition. The probes of material obtained from the centers of the stunting areas were passed into the centrifuge tubes with the supplemented Nutrient Broth, incubated for up to five days at 37°C and tested for the Broth clarity. *Results.* In presence of the metal concentrations ranged between 50 to 500 мМ the inhibitory action of zinc sulfate towards *S.pyogenes* bacteria was 1.5 — 1.7 times higher ($p < 0.001$) than the action of copper sulfate. In presence of 100 and 500 мМ of the metals the action of zinc chloride was 1.2 — 1.3 times higher ($p < 0.05 - 0.1$) than the effects of copper chloride. In presence of 100 and 500 мМ of copper used as chloride its antibacterial action towards *S.agalactiae* bacteria was 8 — 13 per cent higher ($p > 0.1$) than the effects of zinc chloride. Passages of the material obtained from the areas of culture growth inhibition demonstrate clarity of the Broth in 67 — 85 per cent (*S.pyogenes*) or 48 — 67 per cent (*S.agalactiae*) probes with samples from the areas treated with copper salts, and

in 30 per cent probes with samples from the areas treated with the salts of zinc. *Conclusion.* Inhibitory action of copper and zinc ions used in millimolar concentrations in the cultures of *S.pyogenes* and *S.agalactiae* was established. *S.pyogenes* bacteria demonstrate higher than *S.agalactiae* sensitivity to the action of zinc ions measured by the area of the growth inhibition. Also, in a comparison with *S.agalactiae*, the *S.pyogenes* bacteria undergo bactericidal action of zinc ions in a higher part of observations.

Zh.Mikrobiol. (Moscow), 2017, No 3, P. 26—35

Key words: antibacterial action, copper, zinc, *S.pyogenes*, *S.agalactiae*

ВВЕДЕНИЕ

Сегодня не подлежит сомнению ключевая роль катионов металлов в поддержании жизнедеятельности бактериальной клетки и реализации ее патогенных свойств в организме хозяина. Выступая структурными, каталитическими или регуляторными компонентами биомакромолекул, металлы вовлечены в обеспечение многих биологических процессов, принципиально значимых для функционирования клетки бактерии и определяющих ее вирулентность [14, 19, 20].

В то же время, высокие концентрации катионов токсичны для бактерий. Поэтому бактериальная клетка располагает эволюционно закрепленными механизмами и факторами детоксикации, переводящими металл в состояние и форму, снижающие или исключаящие его токсическое воздействие [8, 10, 11].

В реализации своего токсического действия катионы меди и цинка могут конкурировать за сайты связывания в металлопротеинах [7, 13], конкурентно ингибировать поглощение бактериями других металлов [16], опосредовать прямое бактерицидное действие [3, 20].

Ранее нами установлено, что катионы меди и цинка обладают антибактериальным действием в отношении клеток *Staphylococcus aureus* и *Pseudomonas aeruginosa* [2 — 4]. При этом в миллимолярных концентрациях катионы меди реализуют бактерицидное действие, а катионы цинка опосредуют преимущественно бактериостатические эффекты [3]. В физиологических (микромолярных) концентрациях катионы цинка проявляют токсические свойства в отношении бактерий *S.aureus*, катионы меди обеспечивают достижение полного бактерицидного эффекта в культурах *S.aureus* и *P.aeruginosa*, подвергнутых метаболическому стрессу [4]. В связанном белками γ -глобулиновой фракции состоянии катионы меди и цинка реализуют антибактериальное действие в культурах *S.aureus* или *P.aeruginosa* в наномолярных концентрациях [2, 4].

Аналогично *S.aureus* и *P.aeruginosa*, для патогенных стрептококков катионы металлов, в частности цинка, служат важнейшим фактором, обеспечивающим взаимодействие бактерий с организмом хозяина [18]. Они определяют активность ряда поверхностных белков и факторов вирулентности патогенов [18], необходимы для деления бактериальной клетки и поддержания ее жизнедеятельности в ходе инфекционного процесса [6].

Вместе с тем, экспрессия стрептококками поверхностных протеинов, несущих сильный отрицательный заряд и содержащих консервативный общий эпитоп [1], может способствовать поступлению в клетки бактерий избыточных количеств цинка, что вследствие нарушения биосинтеза капсульной гиалуроновой кислоты и других ключевых звеньев метаболизма с необходимостью

будет изменять обменные процессы и снижать вирулентность стрептококков [Ong C.Y. et al., 2015].

Целью работы явилась оценка антибактериального действия миллимолярных концентраций катионов меди и цинка, примененных в виде сульфатов или хлоридов, в культурах *S.pyogenes* и *S.agalactiae*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Культуры бактерий *S.pyogenes* и *S.agalactiae* предоставлены из рабочей коллекции лаборатории индикации и ультраструктурного анализа микроорганизмов В.Г.Жуховицким. В работе использовали по три клинических изолята *S.pyogenes* и *S.agalactiae*.

Для постановки реакций стандартизованную суспензию бактерий, полученную из суточных культур *S.pyogenes* и *S.agalactiae* и содержащую 10^8 КОЕ/мл, засекали газоном из объема 1.0 мл суспензии в физиологическом растворе на стандартные стерильные чашки Петри диаметром 90 мм с питательным агаром Blood Base Agar (HiMedia Lab.), дополненным 10% нормальной лошадиной сыворотки (Микроген) и 1% глюкозы. Спустя 30 мин на поверхность газона с использованием 36-канального штампа-репликатора с диаметром наконечников 2.0 мм каплями объемом по 5 мкл наносили солевые растворы — сульфат меди $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, сульфат цинка $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, хлорид меди $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ и хлорид цинка ZnCl_2 в 0.15 М NaCl (pH 7.11 — 7.31) с концентрацией по катионам металлов от 5×10^{-3} М до 5×10^{-1} М.

На препаративном этапе исследования маточные растворы солей стерилизовали методом мембранной фильтрации с использованием насадок для водно-солевых растворов Millex с диаметром пор 0.22 мкм (Millipore), после чего готовили серии последовательных разведений маточного образца в 0.15 М растворе NaCl, служившим внутренним контролем системы.

После нанесения солевых растворов каплями на газон содержавшие культуры бактерий *S.pyogenes* и *S.agalactiae* чашки Петри инкубировали в течение суток при 37°C. По истечении срока инкубации результат реакции учитывали, определяя диаметр зоны задержки роста культуры с использованием угловой линейки Partigen (Behringwerke AG).

На каждом газоне реакцию бактерий на серию разведений соли металла воспроизводили трижды. Для каждого клинического изолята бактерий использовали при этом не менее двух параллельных чашек Петри.

Для проверки наличия (отсутствия) жизнеспособных бактерий в зонах задержки роста культур и установления вклада бактерицидного компонента в действие солей металлов из центра зоны задержки роста микробиологической петлей диаметром 1.0 мм производили посевы материала в пробирки, содержавшие по 5.0 мл питательного бульона Nutrient Broth (HiMedia Lab.), дополненного 10% нормальной лошадиной сыворотки (Микроген) и 1% глюкозы. Образцы термостатировали в течение срока до 5 суток при 37°C, после чего оценивали прозрачность питательного бульона в сравнении с контрольным — стерильным.

В ходе экспериментов кислотность 0.15 М раствора NaCl контролировали с помощью базового электронного pH-метра Sartorius PB-11, укомплектованного электродом Sartorius PY-P11.

При математической обработке результатов исследования достоверность различия средних величин устанавливали с помощью t-критерия Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Как показывают результаты, представленные на рис. 1, в культуре клеток *S. pyogenes* катионы меди и цинка, примененные в виде сульфата (рис. 1А) или хлорида (рис. 1Б) в миллимолярных концентрациях, реализуют выраженное антибактериальное действие, интенсивность которого при 10-кратном (с 50 до 500 мМ) повышении содержания катионов металлов в среде культивирования нарастает в 1.5 — 1.9 раза ($p < 0.001$ — 0.002). В отдельных случаях при концентрациях металлов менее 5×10^{-2} М в просвете зоны задержки роста наблюдали отдельные мелкие колонии; однако граница зоны определялась четко и позволяла характеризовать зону по ее диаметру.

Обращает на себя внимание более выраженное, чем в присутствии меди, торможение роста бактерий *S. pyogenes* катионами цинка (рис. 1). В диапазоне концентраций металлов от 50 до 500 мМ активность сульфата цинка в 1.5 — 1.7 раза ($p < 0.001$) превосходит действие сульфата меди (рис. 1А). Действие хлорида цинка при концентрациях катионов 100 и 500 мМ в 1.2 — 1.3 раза ($p < 0.05$ — 0.1) превосходит эффекты хлорида меди (рис. 1Б).

Действие катионов цинка нарастает при 10-кратном (с 50 до 500 мМ) повышении содержания металла в среде культивирования тоже более заметно, чем действие меди. Если для катионов меди прирост составляет по кратности 1.5 раза ($p < 0.001$ — 0.002), то в условиях применения катионов цинка размер зоны задержки роста бактерий увеличивается в 1.8 — 1.9 раза ($p < 0.001$) (рис. 1).

При этом заметна разница в действии катионов, определяемая анионным составом соли металла. Бактерии *S. pyogenes* более чувствительны к действию сульфата цинка, которое на отдельных концентрациях катионов превосходит эффекты хлорида в 1.2-1.35 раза ($p < 0.02$ — 0.1) (рис. 1А и Б). У катионов меди обнаруживается тенденция к проявлению более высокой активности металла в составе хлорида, действие которого на отдельных концентрациях катионов превосходит эффекты сульфата в 1.1 — 1.3 раза ($p < 0.1$ или $p > 0.1$) (рис. 1А и Б).

Посевы материала из зон задержки роста культуры *S. pyogenes*, обработанных солями меди, в 67 — 85% наблюдений обнаруживают соответствующую

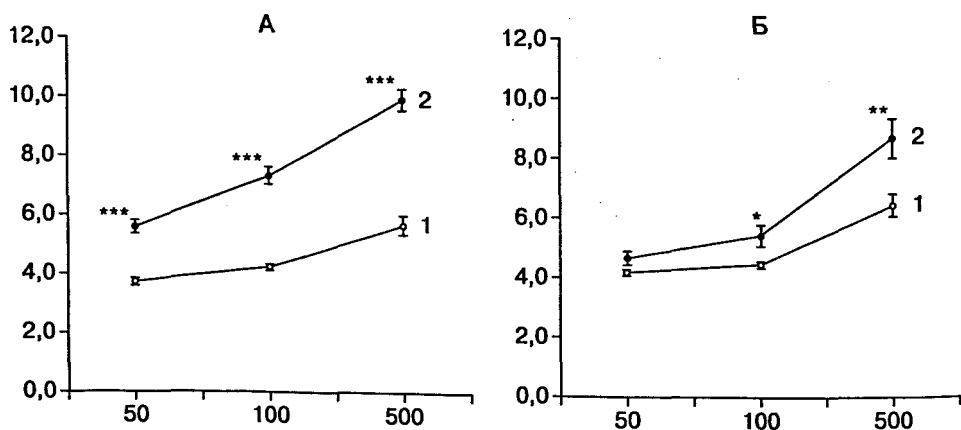


Рис. 1. Торможение роста культуры *S. pyogenes* в присутствии миллимолярных концентраций катионов меди (1) и цинка (2), $M \pm m$, $n=6$ или $n=9$.

* $p < 0.1$; ** $p < 0.05$; *** $p < 0.001$ по сравнению с показателями меди. Здесь и на рис. 2: по оси абсцисс — концентрация катионов металлов, мМ; по оси ординат — диаметр зоны задержки роста, мм. А — водные сульфаты меди (II) и цинка; Б — водный хлорид меди (II) и хлорид цинка.

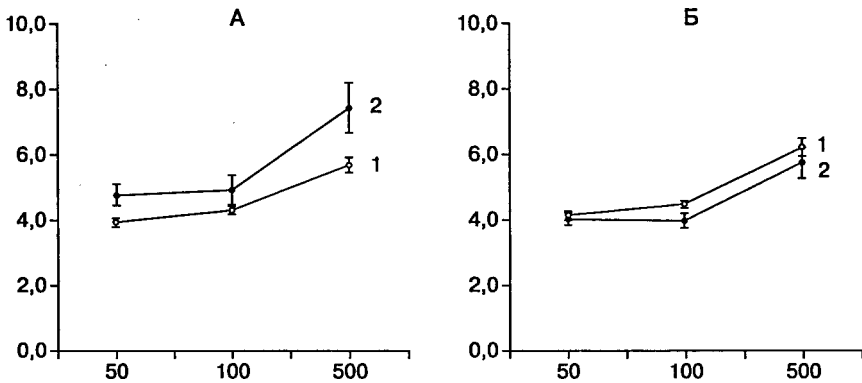


Рис. 2. Торможение роста культуры *S. agalactiae* в присутствии миллимолярных концентраций катионов меди (1) и цинка (2), $M \pm m$, $n=6$ или $n=9$.

контрольной прозрачность питательного бульона. Пробы из зон, обработанных солями цинка, по прозрачности питательного бульона соответствуют стерильному контролю в 30% случаев.

В отношении клеток *S. agalactiae* катионы меди и цинка, примененные в миллимолярных концентрациях в виде сульфата или хлорида, реализуют антибактериальное действие слабее, чем в культуре *S. pyogenes*. Интенсивность действия, оцениваемая по зонам задержки роста, при 10-кратном (с 50 до 500 мМ) повышении содержания катионов металлов в среде культивирования возрастает в 1.4 — 1.6 раза ($p < 0.001 - 0.05$) (рис. 2). И если в условиях применения сульфата и хлорида меди края зон задержки роста, в целом, были четкие и лишь в отдельных случаях отмечено появление единичных мелких колоний по краям, то при действии катионов цинка можно было наблюдать рост колоний как по краям, так и внутри зоны задержки роста.

Как и в отношении бактерий *S. pyogenes*, катионы цинка, примененные в культуре *S. agalactiae* в виде сульфата, в 1.15 — 1.3 раза ($p > 0.1$) активнее катионов меди (рис. 2А). В то же время, хлорид цинка оказывается в 1.2 — 1.3 раза ($p > 0.1$) слабее сульфата, в результате чего действие хлорида меди становится сопоставимо или даже на отдельных концентрациях катионов превосходит на 8 — 13% ($p > 0.1$) эффекты хлорида цинка (рис. 2Б).

Действие катионов меди при 10-кратном (с 50 до 500 мМ) повышении содержания металла в среде культивирования *S. agalactiae* нарастает в 1.4 — 1.5 раза ($p < 0.001$), что соизмеримо с показателем в условиях применения цинка, составляющим по кратности 1.4 — 1.6 ($p < 0.05$).

Посевы материала из зон задержки роста культуры *S. agalactiae*, в отличие от опытов на клетках *S. pyogenes*, обнаруживают помутнение питательного бульона во всех пробах, содержащих образцы из лунок, обработанных солями цинка. Пробы из зон, обработанных солями меди, в 48 — 67% случаев обнаруживают соответствующую контрольной прозрачность питательного бульона.

ОБСУЖДЕНИЕ

Бактерицидное действие металлов на патогенные бактерии, без сомнения, служит прямым указанием на возможность их использования в разработке подходов к созданию новых средств антибактериальной терапии. В то же время, достижение полного бактерицидного эффекта в организме хозяина в большинстве своем лимитировано токсическим воздействием металлов на

собственные, неизменные клетки организма, аналогично бактериям, критически нуждающиеся в поступлении катионов металлов и экспрессирующие эффективные системы инфлюкса катионов.

Одновременно они располагают специфическими транспортерами, активно выводящими металл из клетки во внеклеточное пространство в условиях его избыточного поступления в цитоплазму. Но сколь эффективными окажутся эти транспортеры, когда в ходе инфекционного процесса и воздействия токсических концентраций катионов находящиеся в периклеточном пространстве бактерии в целях собственной детоксикации будут активно экспортировать металл — сказать сложно.

Иное дело — бактериостатичность металлов, более щадящий с точки зрения влияния на жизнедеятельность режим взаимодействия клетки бактерии с катионом, не предполагающий с необходимостью гибель мишени, но вместе с тем, создающий условия торможения роста, ограничения персистенции, снижения динамики формирования биопленок и, следовательно, снижения устойчивости бактерий к действию других факторов противомикробной защиты (лизозима, комплемента, протеолитических ферментов, активных по поверхности клетки). В условиях торможения роста бактерии не могут отвечать на неблагоприятное внешнее воздействие за счет многократного увеличения численности популяции в результате форсированной пролиферации.

В наших исследованиях бактерицидность выступает проявлением в отношении бактерий токсических свойств катионов меди, бактериостатичность преимущественно характеризует действие цинка [3]. Если при этом, как отмечали ранее, антибактериальное действие меди соответствует представлениям о высокой редокс-активности металла, его способности выступать в биологических системах в качестве мощного окислителя и отчасти дестабилизировать взаимодействующие с ним биомакромолекулы, то очевидно, что вклад окислительно-восстановительных реакций в эффекты катионов цинка в большинстве своем отсутствует, поскольку катион цинка в эти реакции не вовлечен [3].

В контексте изложенного действие меди, превалирующее над эффектами цинка, как в культуре *Raeguginosa* [3, 4], или заметно менее выраженное, нежели действие цинка, как у золотистого стафилококка [3] и исследованных стрептококков, не может трактоваться с позиций его специфичности, поскольку деструктурирующий биомакромолекулы окислительный потенциал катионов слишком высок, чтобы предполагать возможность экспонирования биополимерами специфических сайтов связывания меди, которые были бы открытыми на взаимодействие, не занятыми катионами и не подвергались бы в условиях хелатирования опосредованной медью деструкции. Известно, что распределение меди в организме, ткани и даже в отдельной клетке строго локализовано, эпитопически определено и дозировано. Ее содержание в клетках, включая бактериальные, поддерживается в строгом соответствии с потребностями в реализации зависящих от меди функций белков и ферментов. Ее практически нет в свободной, подлежащей обмену форме. Практически вся медь находится в циркуляции и распределяется в органах и тканях в связанном белками, гликопротеинами или аминокислотами состоянии.

Напротив, принимая во внимание неспецифический характер бактерицидного действия редокс-активной меди, его было бы неправомерно распространять на бактериостатическое, а тем более, бактерицидное, действие цинка, не участвующего, как отмечали, в окислительно-восстановительных реакциях и, в отличие от меди, стабилизирующего взаимодействующие с ним

биомакромолекулы и тропные к нему лиганды сайтов связывания. Понятно, что проявляющий высокое сродство к внутримолекулярным структурам и тиоловым группам белков, неактивный в редокс-обмене, но чрезвычайно эффективный в качестве комплексообразователя, способного формировать многочисленные координационные связи, цинк для реализации механизма своего воздействия должен встроиться в структуру связывающего сайта, не разрушая, а конформационно преобразуя ее в новую пространственную конфигурацию. Если это действие приводит к изменению потока сигнальных путей, вовлекающих данную молекулу-мишень, эффект цинка обоснованно трактовать как структурно-регуляторный, коль скоро в локальном микроокружении возникает, по сути, новая структура с новыми или измененными функциями.

А поскольку любая действующая структурно-функциональная связь в основе своей специфична, возникновение на этой же основе любой другой структурно-функциональной связи или изменение действующей не может рассматриваться иначе, как с позиций строгой специфичности, которая, следовательно, характеризует и эффект воздействия фактора, меняющего эту специфичность или создающего новую.

В предложенном контексте специфичность — это функция, обеспеченная структурно и организованная топически. Топика действия цинка — внутриклеточные (бактериальные) сигнальные пути, ответственные за реализацию метаболических процессов, формирующих и поддерживающих состояние и уровень патогенности и вирулентности. Цинк способен обратимо ингибировать гемолитическую активность *Serpulina hyodysenteriae* [9] и угнетать активность протеаз *Borrelia burgdorferi* [17]. В отношении бактерий *S.pyogenes* катионы цинка ингибируют гемолиз [5], активность цистеинпротеазы, необходимой для функционирования ряда факторов патогенности [13], ферменты гликолиза, биосинтез капсульной гиалуроновой кислоты [Ong C.Y. et al., 2015].

Не подлежит сомнению многофакторное с позиций получаемого результата и многоточечное с позиций определения мишенивой локализации и топики реакции, в высокой степени специфическое воздействие катионов цинка, которое в ряде наблюдений оказывается обратимым, что, само по себе, служит свидетельством специфичности реакции, поскольку она, следовательно, может быть воспроизведена новым воздействием на те же молекулярные мишени.

В контексте изложенного логичным видится существование у стрептококков межвидовых различий по чувствительности к действию катионов цинка. Средний диаметр зоны задержки роста, оцененный совокупно в присутствии сульфата и хлорида цинка, составляет 9.3 мм в культуре *S.pyogenes* и 6.6 мм в культуре *S.agalactiae*.

Понятно, что если мишенью воздействия катионов выступают внутриклеточные сигнальные пути, детерминирующие синтез или активность факторов патогенности микроорганизмов, таких мишеней с необходимостью должно быть больше и выраженность их экспрессии должна быть выше у патогенных *S.pyogenes*, нежели у условно патогенных *S.agalactiae*, входящих в состав нормальной микрофлоры кишечника человека и обладающих существенно меньшей в сравнении с *S.pyogenes* гемолитической активностью [12, 15, 21]. Неспецифическое бактерицидное действие катионов меди, практически не различающееся в культурах *S.pyogenes* и *S.agalactiae*, служит адекватным контролем специфическим эффектам катионов цинка.

В использованном алгоритме сравнения бактерии *S.aureus* проявляют более высокую, чем *S.pyogenes*, чувствительность к действию катионов цинка. Средний диаметр зоны задержки роста в культуре *S.aureus* составляет 10.9 мм [3], в культуре бактерий *P.aeruginosa* показатель соответствует 6.4 мм [3].

Таким образом, использованная методика оценки торможения роста бактерий в культуре позволяет установить наличие и вклад в жизнедеятельность бактериальной клетки внутриклеточных сигнальных путей, которые могут быть блокированы специфическим воздействием катионов металлов. Она, следовательно, становится применимой в скрининговых исследованиях, предполагающих отбор катионов металлов, обладающих наиболее выраженным токсическим воздействием на определенные виды патогенных бактерий.

ЛИТЕРАТУРА

1. Костюкова Н.Н., Бехало В.А. Факторы патогенности пневмококка и их протективные свойства. Журн. микробиол. 2014, 3: 67-77.
2. Чекнев С.Б., Вострова Е.И., Писковская Л.С., Востров А.В. Эффекты катионов меди и цинка, связанных белками γ -глобулиновой фракции, в культуре *Staphylococcus aureus*. Журн. микробиол. 2014, 3: 4-9.
3. Чекнев С.Б., Вострова Е.И., Апресова М.А., Писковская Л.С., Востров А.В. Торможение роста бактерий в культурах *Staphylococcus aureus* и *Pseudomonas aeruginosa* в присутствии катионов меди и цинка. Журн. микробиол. 2015, 2: 9-17.
4. Чекнев С.Б., Вострова Е.И., Сарычева М.А., Востров А.В. Торможение роста бактерий в культурах *Staphylococcus aureus* и *Pseudomonas aeruginosa* катионами меди и цинка, примененными в физиологических концентрациях. Журн. микробиол. 2016, 3: 9-18.
5. Avigad L.S., Bernheimer A.W. Inhibition by zinc of hemolysis induced by bacterial and other cytolytic agents. Infect. Immunity. 1976, 13 (3): 1378-1381.
6. Bayle L., Chimalapati S., Schoehn G. et al. Zinc uptake by *Streptococcus pneumoniae* depends on both AdcA and AdcAII and is essential for normal bacterial morphology and virulence. Molec. Microbiol. 2011, 82 (4): 904-916.
7. Blencowe D.K., Morby A.P. Zn(II) metabolism in prokaryotes. FEMS Microbiol. 2003, 27: 291-311.
8. Botella H., Stadthagen G., Lugo-Villarino G. et al. Metallobiology of host-pathogen interactions: an intoxicating new insight. Trends Microbiol. 2012, 20 (3): 106-112.
9. Dupont D.P., Duhamel G.E., Carlson M.P., Mathiesen M.R. Effect of divalent cations on hemolysin synthesis by *Serpulina* (*Treponema*) *hyodysenteriae*: inhibition induced by zinc and copper. Vet. Microbiol. 1994, 41: 63-73.
10. Hodgkinson V., Petris M.J. Copper homeostasis at the host-pathogen interface. J. Biol. Chemistry. 2012, 287 (17): 13549-13555.
11. Hood M.I., Skaar E.P. Nutritional immunity: transition metals at the pathogen-host interface. Nature Rev. Microbiol. 2012, 10: 525-537.
12. Joseph E.A. Streptococcal toxins (streptolysin O, streptolysin S, erythrogenic toxin). Pharmac. Ther. 1980, 11: 661-717.
13. Krishnan K.C., Mukundan S., Figueroa J.A.L. et al. Metal-mediated modulation of streptococcal cysteine protease activity and its biological implications. Infect. Immunity. 2014, 82 (7): 2992-3001.
14. Phan T.N., Buckner T., Sheng J. et al. Physiologic actions of zinc related to inhibition of acid and alkali production by oral streptococci in suspensions and biofilms. Oral Microbiol. Immunol. 2004, 19 (1): 31-38.
15. Rajagopal L. Understanding the regulation of group B streptococcal virulence factors. Future Microbiol. 2009, 4 (2): 201-221.
16. Rosado J.L. Zinc and copper: proposed fortification levels and recommended zinc compounds. J. Nutrition. 2003, 133 (Suppl.): 2985-2989.
17. Russell T.M., Tang X., Goldstein J.M. et al. The salt-sensitive structure and zinc inhibition of *Borrelia burgdorferi* protease BbHtrA. Molecular Microbiol. 2016, 99 (3): 586-596.
18. Shafeeq S., Kuipers O.P., Kloosterman T.G. The role of zinc in the interplay between pathogenic streptococci and their hosts. Molecular Microbiol. 2013, 88 (6): 1047-1057.

19. Stafford S.L., Bokil N.J., Achard M.E.S. et al. Metal ions in macrophage antimicrobial pathways: emerging roles for zinc and copper. *Bioscience Reports*. 2013, 33 (4): 541-554.
20. Weston B.F., Brenot A., Caparon M.G. The metal homeostasis protein, Lsp, of *Streptococcus pyogenes* is necessary for acquisition of zinc and virulence. *Infect. Immunity*. 2009, 77 (7): 2840-2848.
21. Whidbey C., Vornhagen J. A streptococcal lipid toxin induces membrane permeabilization and pyroptosis leading to fetal injury. *EMBO Mol. Med*. 2015, 7: 488-505.

Поступила 15.08.16

Контактная информация: Чекнев Сергей Борисович, д.м.н.,
123098, Москва, ул. Гамалеи, 18, р.т. (499)190-43-88

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2017

*С.А.Гуляев¹, А.А.Ляшенко¹, А.М.Чумаков¹, А.А.Сорокин¹, И.В.Гордейчук¹,
И.А.Потемкин^{2,3}, О.В.Исаева^{2,3}, К.К.Кюрегян^{2,3}, М.И.Михайлов^{2,3}*

ИЗУЧЕНИЕ ИММУНОГЕННОСТИ ПРОТОТИПНОГО ВАКЦИННОГО ПРЕПАРАТА ПРОТИВ ГЕПАТИТА Е

¹ФНЦ исследования и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П.Чумакова,
²Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования,
³НИИ вакцин и сывороток им. И.И.Мечникова, Москва

Цель. Оценить специфическую иммуногенную активность прототипного варианта вакцины против гепатита Е (ГЕ). *Материалы и методы.* Нелинейных мышей, самцов (n=170), иммунизировали однократно внутривнутрибрюшинно прототипной вакциной против ГЕ в дозах 5, 10 и 20 мкг/животное. Анти-ВГЕ IgG определяли методом ИФА с видоспецифичным конъюгатом на 7, 14, 21 и 28 дни после иммунизации. Для оптимизации условий иммуногенности вакцины 250 мышам, разделенным на 25 групп по 10 голов в каждой, однократно вводили экспериментальные образцы вакцинного препарата, содержащие 20 мкг антигена и композиции адъювантов на основе алюминия гидроксида и иммуномодуляторов полиоксидония и глутоксима. Анти-ВГЕ определяли в образцах сыворотки крови мышей на 28 день после иммунизации и рассчитывали среднюю иммунизирующую дозу (ID₅₀) для каждой композиции вакцинного препарата. *Результаты.* Увеличение иммуногенности при одной и той же стандартной дозе антигена (20 мкг) при использовании в качестве адъюванта глутоксима в концентрации 10 мг/мл в растворе алюминия гидроксида (0,5 мг/мл) составило 51,4%. Для композиции вакцины с полиоксидонием (1,0 мг/мл) также наблюдали незначительное увеличение иммуногенности, однако оно не было статистически значимым при сравнении со стандартным адъювантом (алюминия гидроксид 0,5 мг/мл). *Заключение.* Полученные данные свидетельствуют о высокой иммуногенности вакцинного препарата против гепатита Е. Применение в композиции экспериментальной вакцины против гепатита Е иммуномодулятора глутоксима обеспечивает ее наибольшую иммуногенность.

Журн. микробиол., 2017, № 3, С. 35—43

Ключевые слова: вирус гепатита Е (ВГЕ), анти-ВГЕ, антиген, вакцина, иммуногенность

*S.A.Gulyaev¹, A.A.Lyashenko¹, A.M.Chumakov¹, A.A.Sorokin¹, I.V.Gordeichuk¹,
I.A.Potemkin^{2,3}, O.V.Isaeva^{2,3}, K.K.Kyuregyan^{2,3}, M.I.Mikhaylov^{2,3}*

STUDY OF IMMUNOGENICITY OF A PROTOTYPE VACCINE AGAINST HEPATITIS E

¹Chumakov Federal Scientific Centre of Research and Development of Immune Biological Preparations, ²Russian Medical Academy of Continuous Professional Education, ³Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russia