

УДК 616.94-022.7

ВЛИЯНИЕ АДРЕНАЛИНА *IN VITRO* НА ПАТОГЕННОСТЬ ГОСПИТАЛЬНЫХ СТАФИЛОКОККОВ

В. В. Леонов*, кандидат технических наук,
Л. В. Леонова,
Т. Н. Соколова, кандидат биологических наук,
Л. Н. Деревянко, кандидат медицинских наук

БУ ВО ХМАО-Югры «Ханты-Мансийская государственная медицинская академия», 628011, Россия,
ХМАО-Югра, г. Ханты-Мансийск, ул. Мира, д. 40

РЕЗЮМЕ Изучено влияние адреналина *in vitro* на патогенность госпитальных и негоспитальных вариантов стафилококков. Выявлено, что добавление адреналина к культуре *S. aureus* вызывает увеличение плотности популяции и способствует увеличению адгезивной активности и экспрессии гемолизина. Эффекты адреналина на госпитальные изоляты *S. aureus* выражены сильнее, чем на негоспитальные варианты.

Ключевые слова: *S. aureus*, эпинефрин, адреналин, адгезия, удельная скорость роста, гемолитическая активность.

* Ответственный за переписку (*corresponding author*): leonovvadim@yandex.ru.

Несмотря на активное изучение свойств госпитальных штаммов микроорганизмов, проблема их формирования и персистенции остается актуальной. Основной средой обитания и эволюции госпитальных штаммов является организм больного человека, и, по данным современных исследований [11], микроорганизмы приспособились использовать вещества, обуславливающие и/или опосредующие защиту организма от патогена, как ростовые факторы. Особый интерес в этом отношении представляют биогенные амины. Они могут влиять на взаимодействие макро- и микроорганизма в ходе развития инфекционного стресса.

Действительно, А. В. Олескин и соавт. показали, что добавление серотонина и дофамина к культуральной среде *Escherichia coli* и *Rhodospirillum rubrum* стимулирует их пролиферативную активность [1]. Методом высокоэффективной жидкостной хроматографии эти же авторы обнаружили серотонин в биомассе бактерий *Bacillus subtilis* и *Staphylococcus aureus*, норадреналин у *B. subtilis*, *B. cereus*, *Proteus vulgaris* и *Serratia marcescens*, грибка *Penicillium chrysogenum* [2]. M. Lyte et al.

впервые показали, что нейроэндокринные гормоны стресса (катехоламины) играют важную роль в регуляции бактериальной вирулентности грамотрицательных патогенов [9, 11].

В связи с изложенным выше можно предполагать возможность участия катехоламинов в регуляции патогенности грамположительных бактерий, поэтому целью настоящего исследования явилось выяснение *in vitro* влияния эпинефрина (адреналина) на факторы патогенности госпитальных и негоспитальных штаммов *Staphylococcus aureus*.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В работе использованы два эталонных штамма ATCC 25923 и 209P, три негоспитальных (4844, 352, 372) и пять госпитальных (2888, 2891, 4954, 391, 334) изолятов *S. aureus*, выделенные из разных биотопов больных ожогового центра ОКБ № 1 г. Тюмень и инфекционного отделения ОКБ г. Ханты-Мансийска. Все изоляты предварительно были идентифицированы общепринятыми методиками по совокупности морфологических,

V. V. Leonov, L. V. Leonova, T. N. Sokolova, L. N. Derevyanko

THE PATHOGENICITY OF HOSPITAL STAPHYLOCOCCI: THE IMPACT OF ADRENALINE *IN VITRO*

ABSTRACT The impact of adrenaline *in vitro* on the pathogenicity of hospital and extra-hospital staphylococci was studied. It was revealed that the addition of adrenaline into *S. aureus* culture resulted in the population density increase and was conducive to the increase of adhesive activity and hemolysine expression. The effects of adrenaline on the hospital isolates of *S. aureus* were more pronounced in comparison with extra-hospital variants.

Key words: *S. aureus*, epinephrine, adrenaline, adhesion, specific growth rate, hemolytic activity.

тинкториальных и биохимических признаков. Вид микроорганизма был определен с помощью коммерческой тест-системы «Staphytest» (Lachema, Чехия). Штамм считали госпитальным на основании резистентности к пяти и более антибиотикам [5].

Бактерии выращивали в LB-среде (триптон – 10,0 г/л, дрожжевой экстракт – 5,0 г/л, NaCl – 5,0 г/л, pH 7,0). Адреналин солянокислый («Sigma», Германия) добавляли в питательную среду из более концентрированного стерильного раствора до конечной концентрации 6,8 нмоль, что соответствует его нормальной физиологической концентрации в организме человека.

В контроль вносили солянокислый раствор, не содержащий адреналин. Рост микроорганизмов оценивали турбидиметрически ($\lambda = 540$ нм). Для количественной оценки стимулирующего эффекта адреналина рассчитывали удельные скорости роста (μ , ч⁻¹) микроорганизмов как тангенс угла наклона касательной к начальному участку кривой роста в координатах (A, t).

Количественную оценку адгезивной активности проводили по В. И. Брилису с соавт. [6] с отмытыми формализированными эритроцитами человека I (0) группы крови через 12 ч культивирования с добавлением и без добавления адреналина, рассчитывали средний показатель адгезии (СПА).

Гемолитическую активность определяли фотометрическим методом по лизису эритроцитов человека 0 (I) группы Rh (+) [3].

Все результаты обрабатывали статистически с использованием t-критерия Стьюдента [4].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для проведения эксперимента *in vitro* мы выбрали следующие параметры, характеризующие патогенность стафилококков: адгезия к поверхности эритроцитов (фактор адгезии), гемолитическая активность (фактор агрессии) и рост/размножение (универсальное свойство всего живого).

Начальным и необходимым этапом развития инфекционного процесса является адгезия микроорганизмов – способность прикрепляться к слизистой эпителия с помощью специальных адгезинов, входящих в состав клеточной стенки грамположительных бактерий.

Изучение адгезивной активности стафилококков показало, что все исследованные штаммы имеют средние адгезивные способности (СПА 1,9–2,4). При добавлении в питательную среду адреналина у одного эталонного ATCC 25923 и пяти госпитальных штаммов *S. aureus* (2888, 2891, 4954, 391, 334) наблюдается сдвиг в сторону усиления адгезивных свойств ($p < 0,05$), а у двух штаммов (209 и 352) – снижение СПА с 2,2 до 1,9 ($p < 0,05$). У штаммов 372 и 4844 *S. aureus* добавление адреналина в питательную среду не вызывало изменений адгезивных характеристик по сравнению с контролем.

На рис. 1 приведены кривые роста эталонного ATCC 25923 и госпитального 352 штаммов *S. aureus* с добавлением и без добавления в питательную среду адреналина. Добавление адреналина вызывает сокращение лаг-фазы роста *S. aureus*. Наибольший стимулирующий эффект в отношении накопления биомассы наблюдается в первые 3 часа культивирования, а на последующих стадиях он сглаживался.

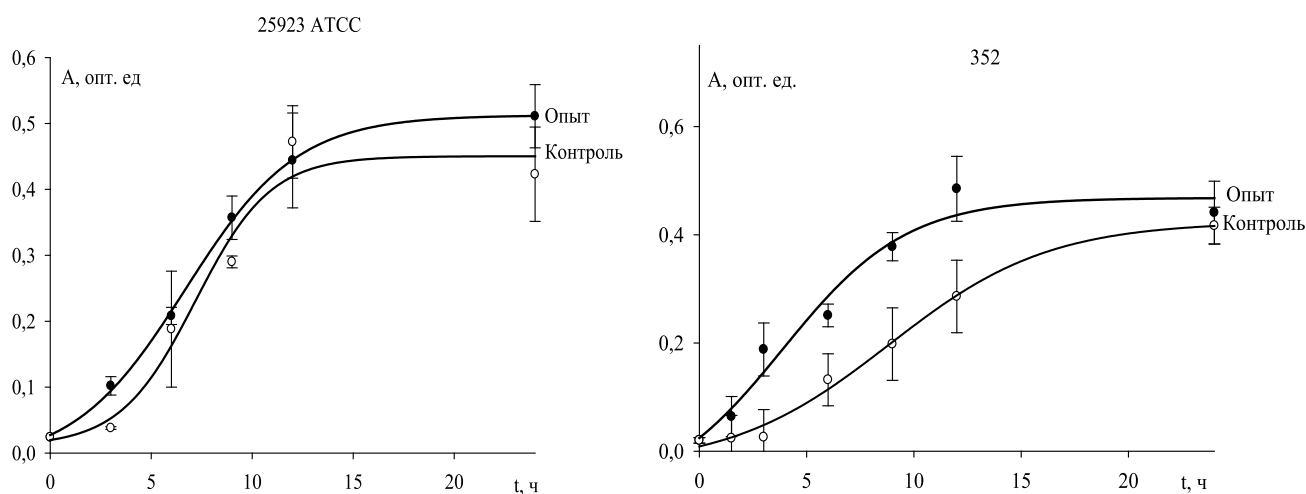


Рис. 1. Кривые роста *S. aureus* ATCC 25923 (а) и 352 (б) на LB-среде с добавлением (опыт) и без добавления (контроль) адреналина

В целом значения μ для всех исследованных штаммов изменялись от 0,27 до 1,07 ч⁻¹ (рис. 2). Адреналин увеличивал удельную скорость роста госпитальных стафилококков в среднем в 1,5 раза. Наибольшее увеличение скорости роста (в 2,5 раза) происходило при добавлении адреналина к культуре госпитального штамма 2891. В отношении исследованных нами негоспитальных штаммов стимулирующий эффект адреналина был выражен слабее: удельная скорость роста увеличилась в среднем лишь в 1,2 раза, а изолят 372 оказался индифферентным к влиянию адреналина.

Многие исследователи считают гемолизины фактором агрессии и инвазии, имеющим важное патогенетическое значение при стафилококковых инфекциях. В связи с этим мы изучили влияние адреналина на гемолитическую активность госпитальных и негоспитальных стафилококков. Результаты показали (табл.), что все исследованные штаммы *S. aureus* обладают низкой гемолитической активностью (<20%).

Гемолитическая активность негоспитальных изолятов составляла 2,0% и заметно не изменялась при добавлении адреналина – 3,3 и 3,8% для штаммов ATCC 25923 и 4844 соответственно. Добавление адреналина к госпитальным изолятам приводило к более существенному увеличению показателя – в 1,7–2,5 раза. Наибольшее увели-

чение гемолитической активности наблюдалось у госпитального изолята 2888 – с 6,2 до 14,7%.

В результате исследования установлено, что адреналин меняет патогенность стафилококков, причем его влияние на госпитальные изоляты *S. aureus* выражено сильнее, чем на негоспитальные варианты.

Полученные результаты могут быть частично объяснены с помощью явления *quorum sensing* – «чувства кворума». Это механизм, с помощью которого патогены «определяют» плотность своей популяции. Соответственно, патогенные бактерии могут «чувствовать» необходимость экспрессии факторов патогенности при достижении определенной плотности популяции [10]. Ростостимулирующий эффект адреналина как в отношении госпитальных, так и негоспитальных штаммов *S. aureus* позволяет предполагать существование рецепторов к адреналину на поверхности бактериальной клетки. Действительно, есть доказательства существования прокариотических рецепторов для гормонов организма хозяина, например инсулина [7]. Очевидно, что госпитальные штаммы лучше приспособлены к условиям организма хозяина и поэтому сильнее стимулируются адреналином, чем негоспитальные изоляты.

Таким образом, добавление адреналина к культуре *S. aureus* вызывает максимальное увеличение

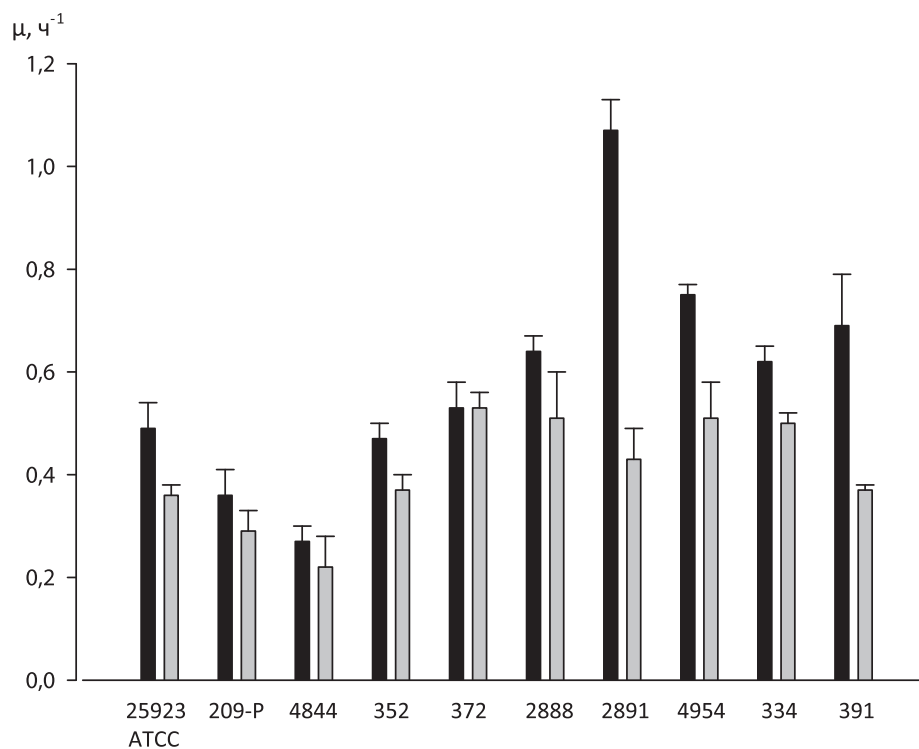


Рис. 2. Удельные скорости роста (μ , ч⁻¹) *S. aureus* на LB-среде с добавлением (■) и без добавления (■) адреналина

Таблица. Гемолитическая активность *S. aureus* с добавлением (опыт) и без добавления (контроль) адреналина, %

Культура	Штамм				
	АТСС 25923	4844	2888	2891	4954
Опыт	3,3 ± 0,3	3,8 ± 0,2	14,7 ± 0,6	4,8 ± 0,2	11,5 ± 0,3
Контроль	2,0 ± 0,2	2,0 ± 0,1	6,2 ± 0,3	2,8 ± 0,2	4,6 ± 0,2

плотности популяции уже в первые 3 часа роста и может способствовать увеличению СПА и экспрессии гемолитической активности.

Следует отметить, что представленные результаты экспериментов по влиянию адреналина на патогенность стафилококков были получены в осенне-зимний период. Проведение эксперимента в день весеннего равноденствия нивелировало все эффекты адреналина, последующие попытки в весенне-летний период также были безуспешными. Аналогичный эффект сезонного влияния был выявлен при изучении влияния серотонина

на рост дрожжей *Candida guilliermondii* и бактерий *Streptococcus faecalis* [8]. Авторы объяснили этот феномен увеличением скорости роста микроорганизмов в весенне-летний период.

ВЫВОДЫ

1. Добавление адреналина к культуре *S. aureus* стимулирует ее пролиферативную активность и усиливает патогенность.
2. Стимулирующее влияние адреналина выражено сильнее на госпитальные штаммы *S. aureus*, чем на негоспитальные.

ЛИТЕРАТУРА

1. Действие серотонина (5-окситриптамина) на рост и дифференциацию микроорганизмов / А. В. Олескин [и др.] // Микробиология. – 1998. – Т. 67, № 3. – С. 306–311.
2. Детекция нейромедиаторных аминов у микроорганизмов методом высокоэффективной жидкостной хроматографии / Е. А. Цавкелова [и др.] // Доклады Российской академии наук. – 2000. – Т. 372. – С. 840–842.
3. Железозависимый синтез гемолизина *Staphylococcus aureus* / В. В. Леонов [и др.] // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2012. – Т. 153, № 1. – С. 49–51.
4. Лурье, Ю. Ю. Справочник по аналитической химии / Ю. Ю. Лурье. – 4-е изд., перераб. и доп. – М.: Химия, 1971. – 456 с.
5. Меньшиков, Д. Д. Тест-методы как одно из направлений в диагностике антибиотикорезистентности микроорганизмов / Д. Д. Меньшиков, Е. Д. Меньшикова // Клиническая лабораторная диагностика. – 2002. – № 6. – С. 35–37.
6. Методика изучения адгезивного процесса микроорганизмов / В. И. Брилис [и др.] // Лабораторное дело. – 1986. – № 4. – С. 210–212.
7. Механизмы выживания бактерий / О. В. Бухарин [и др.]. – М.: Медицина, 2005. – 367 с.
8. Страховская, М. Г. Стимулирующее влияние серотонина на рост дрожжей *Candida guilliermondii* и бактерий *Streptococcus faecalis* / М. Г. Страховская, Э. В. Иванова, Г. Я. Фрайкин // Микробиология. – 1993. – Т. 62, № 1. – С. 46–49.
9. Freestone, P. P. E. Microbial endocrinology: experimental design issues in the study of interkingdom signalling in infectious disease. *Advances in Applied Microbiology* / P. P. E. Freestone, M. Lyte. – 2008. – Vol. 64. – P. 75–105.
10. Kievit, T. R. de. Bacterial quorum sensing in pathogenic relationships / T. R. de Kievit, B. H. Iglewski // *Infection and Immunity*. – 2000. – Vol. 68. – P. 4839–4849.
11. Lyte, M. Production of an autoinducer of growth by norepinephrine cultured *Escherichia coli* O157:H7 / M. Lyte, C. D. Frank, B. T. Green // *FEMS Microbiology Letters*. – 1996. – Vol. 139. – P. 155–164.