

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ РОЛИ АНТИОКСИДАНТНЫХ ФЕРМЕНТОВ *CANDIDA ALBICANS* В ПАТОГЕНЕЗЕ КАНДИДОЗА

Курбанов А.И.

Кафедра медицинской микробиологии и иммунологии Азербайджанского медицинского университета, г. Баку
©Курбанов А.И., 2008

Представленное исследование посвящено изучению роли антиоксидантных ферментов (АОФ) — каталазы и супероксиддисмутазы *Candida albicans* в патогенезе экспериментального кандидоза. Установлено, что у штамма, обладающего максимальной активностью антиоксидантных ферментов, относительно высокая выживаемость внутри макрофагов, что вызывает относительно более высокую обсемененность во внутренних органах белых мышей, а также индуцирует сравнительно более интенсивный иммунный ответ. Механизм участия АОФ в патогенезе кандидоза обсуждается.

Ключевые слова: иммунный ответ, *Candida albicans*, каталаза, супероксиддисмутаза, фагоцитоз

THE ROLE OF *CANDIDA ALBICANS*' ANTIOXIDANT ENZYMES ON PATHOGENESIS IN CANDIDOSIS (EXPERIMENTAL STUDYING)

Kurbanov A.I.

Department of medical microbiology and immunology of Azerbaijan Medical University, Baku
©Kurbanov A.I., 2008

In the present research we have studied the role of intracellular antioxidant enzymes — catalase and superoxide dismutase (SOD) of *Candida albicans* in pathogenesis of experimental candidosis. Strains of *C. albicans* different in activities of catalase and superoxide dismutase (SOD) were used. It is established, that strain of *C. albicans* with a maximum activity of intracellular antioxidant enzymes were higher resistance to killing inside of mice macrophages, caused higher contamination of internal organs and induced stronger immune response to experimental infections.

Key words: *Candida albicans*, catalase, immune response, phagocytosis, superoxide dismutase

Антиоксидантные ферменты (АОФ) — каталаза и супероксиддисмутаза (СОД) защищают микроорганизмы от экзогенных и эндогенных окислительных стрессов, нейтрализуя свободные кислородные радикалы. Известно, что основной механизм обезвреживания поглощенных микроорганизмов фагоцитами осуществляется кислородозависимыми механизмами. При этом фагоциты свободными кислородными радикалами подвергают киллингу поглощенные микроорганизмы, такими как супероксидный ион — O_2^- , гидроксильный радикал — OH^\cdot , синглетный кислород — 1O_2 , оксид азота — NO и др., которые, в свою очередь, могут нейтрализоваться антиоксидантными ферментами (АОФ), в частности, каталазой и супероксиддисмутазой (СОД). Таким образом, микроорганизмы приобретают резистентность, адаптируются к окислительному стрессу, свойственному фагоцитирующим клеткам, вследствие чего они могут выживать внутри фагоцитов, а нередко — и в очаге воспаления [1-3].

В настоящем исследовании мы изучили роль каталазы и СОД *Candida albicans* в патогенезе экспериментального кандидоза. С этой целью сравнительно изучили фагоцитоз *C. albicans* перитонеальными макрофагами белых мышей *in vitro*, обсемененность внутренних органов, а также интенсивность гуморального и клеточного иммунитета у белых мышей при экспериментальной инфекции, вызванной штаммами *C. albicans*, отличающимися активностью АОФ.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Активность каталазы и СОД определяли в лизате грибковых клеток. Использовали 18-часовые культуры лабораторных штаммов *C. albicans*, выращенных на среде Сабуро. Клетки микроорганизмов дезинтегрировали на ультразвуковом дезинтеграторе, после чего спектрофотометрическим методом определяли внутриклеточные антиоксидантные ферменты. За единицу каталазы была принята активность фермента, которая разлагает 1 мкмоль H_2O_2 в мин., а за единицу СОД — активность фермента, ингибирующая восстановление нитросинего тетразолия на 50% в мин.

В экспериментах было использовано 36 неинбредных мышей, весом 20-25 г, в возрасте 2-3 мес. Животных заражали внутрибрюшинным введением суспензии *C. albicans*, содержащей 10^7 микробных клеток в 1 мл физиологического раствора. Спустя 5 дней животных, после декапитации под эфирным наркозом, вскрывали. Из стерильно взятых внутренних органов: печени, почек, селезенки и легких готовили гомогенаты и количественно засеивали на агар Сабуро. Посевы инкубировали в термостате при 37 °C в течение 2-х суток. Выросшие колонии подсчитывали, определяли количество колониеобразующих единиц (КОЕ) в 1 г первичной ткани и выражали в натуральных логарифмах (ln).

Фагоцитоз микроорганизмов перитонеальными макрофагами белых мышей *in vitro* изучен предложенной нами микромодификацией метода, описанного Г.Фримеля [4]. Определяли фагоцитарную активность, фагоцитарный показатель и киллинг. В процессе фагоцитоза способность фагоцитов убивать микроорганизмы (киллинг) оценена по снижению количества клеток гриба после определенного времени взаимоотношения с макрофагами и выражена в процентах.

Титры специфических антител в сыворотке крови зараженных животных определяли в реакции агглютинации. Клеточный иммунитет оценивали весовым методом в реакции гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ), в foot-pad тесте.

Статистическую обработку полученных результатов проводили по общепринятой методике с определением Р критерия Стьюдента. Разницу считали достоверной, сравнивая с контролем, при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Установлено, что активность каталазы и СОД у штаммов *C. albicans* варьирует в широком диапазоне. Так, активность каталазы у изученных штаммов *C. albicans* варьировала от 18,5 до 43,5 ед./мг, а активность СОД – от 198,4 до 384,2 ед./мг. После определения содержания каталазы и СОД нами выбраны штаммы с максимальной и минимальной активностями этих ферментов для дальнейшего исследования.

Некоторые показатели фагоцитоза (фагоцитарная активность и фагоцитарный показатель) макрофагами штаммов, обладающих максимальной и минимальной активностями ферментов каталазы и СОД, не отличались. Однако обнаружили определенную зависимость киллинга от активности антиоксидантных ферментов *C. albicans*. Так, выявлено слабое уничтожение макрофагами штамма, обладающего максимальными активностями каталазы и СОД. Однако кандидацидная активность макрофагов по отношению к штаммам, обладающим минимальными активностями этих ферментов, была высокой. Киллинг штамма *C. albicans* с минимальной активностью антиоксидантных ферментов после взаимодействия с макрофагами составил $24,2 \pm 2,7\%$, в то время как у штамма с максимальной активностью антиоксидантных ферментов – всего $14,9 \pm 2,3\%$ ($p < 0,05$).

Таким образом, штамм *C. albicans* с максимальными активностями внутриклеточных антиоксидантных ферментов проявлял относительно высокую выживаемость внутри макрофагов при сравнении со штаммом с минимальными активностями этих ферментов. Механизм данного явления однозначно можно объяснить антифагоцитарной активностью каталазы и СОД. Так, защищая микробные клетки от действия кислородных радикалов внутри фаголизосом, эти ферменты способствуют более длительному выживанию микроорганизмов внутри фагоцитов. Таким образом, установили определенную роль вну-

триклеточных каталазы и СОД микроорганизмов при фагоцитозе *C. albicans*.

Количество КОЕ во внутренних органах животных, зараженных *C. albicans*, также отличалось в зависимости от активности АОФ (рис.1). Так, натуральный логарифм количества высеванных КОЕ штамма *C. albicans* с минимальной и максимальной активностями антиоксидантных ферментов в печени, селезенки, почек и легких соответствовал: $7,87 \pm 0,15$ и $8,40 \pm 0,10$ ($p < 0,05$), $7,36 \pm 0,19$ и $8,10 \pm 0,17$ ($p < 0,05$), $6,97 \pm 0,19$ и $7,77 \pm 0,21$ ($p < 0,05$), $6,16 \pm 0,34$ и $7,26 \pm 0,22$ ($p < 0,05$).

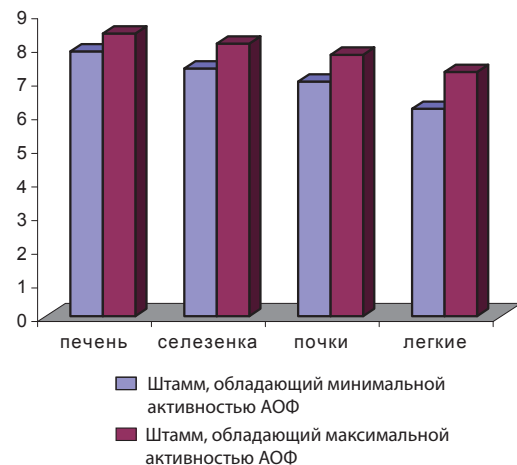


Рис. 1. Обсемененность внутренних органов белых мышей, зараженных штаммами *C. albicans*, отличающимися активностью антиоксидантных ферментов (АОФ). По оси ординат – натуральный логарифм количества высеванных КОЕ из 1 г ткани соответствующего органа

Таким образом, штамм *C. albicans*, обладающий максимальной активностью внутриклеточных антиоксидантных ферментов, вызывает относительно более высокую обсемененность внутренних органов при экспериментальных инфекциях по сравнению со штаммом, содержащим минимальное количество этих ферментов. Механизм данного явления можно объяснить антифагоцитарной активностью каталазы и СОД: защищая микробные клетки от действия кислородных радикалов внутри фагосом, эти ферменты способствуют более длительному выживанию микроорганизмов. Персистенция микроорганизмов в организме ухудшает течение инфекционного процесса и тем самым обуславливает более высокое количественное содержание их во внутренних органах.

Сравнительно изучены и некоторые показатели гуморального и клеточного иммунитета у животных, зараженных штаммами *C. albicans*, отличающимися активностью антиоксидантных ферментов. Спустя 7 дней после заражения, обратные титры специфических антител в сыворотке крови животных против штаммов *C. albicans*, обладающих минимальной и максимальной активностями этих ферментов, соответствовали 46 ± 6 и $26 \pm 3,1$ ($p < 0,05$). Спустя 14 дней после заражения, в динамике накопления антител прослежена иная тенденция. В этот период титры антител против штамма с минимальной активностью

стью антиоксидантных ферментов были низкими в отличие от штамма с максимальной активностью этих ферментов. Так, обратные титры специфических антител в сыворотке крови животных против штаммов *C. albicans*, обладающих минимальной и максимальной активностями этих ферментов, были соответственно 68 ± 9 и 110 ± 12 ($p < 0,05$).

В динамике формирования клеточного иммунитета мы проследили такую же аналогию. Отмечали высокую гиперчувствительность замедленного типа (ГЗТ) к штамму, обладающему минимальной активностью антиоксидантных ферментов, в ближайшие сроки (через 7 дней) после заражения. А в дальнейшем (через 14 дней) интенсивность ГЗТ против этого штамма была низкой при сравнении со штаммом, обладающим максимальной активностью АОФ (рис. 2). Так, спустя 7 дней после заражения, интенсивность ГЗТ против штаммов *C. albicans*, обладающих минимальной и максимальной активностями этих ферментов, соответствовала $21,7 \pm 2,2\%$ и $13,4 \pm 1,4\%$ ($p < 0,05$). В дальнейшем – на 14-й день после заражения интенсивность ГЗТ против штаммов *C. albicans*, обладающих минимальной и максимальной активностями ферментов, соответствовала $24,8 \pm 1,7\%$ и $31,6 \pm 2\%$ ($p < 0,05$).

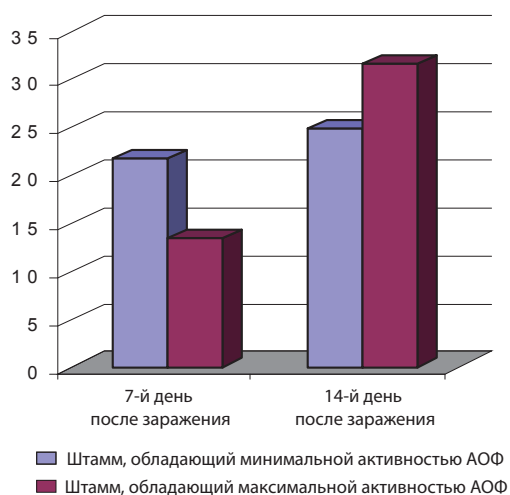


Рис. 2. Динамика формирования ГЗТ против штаммов *C. albicans*, отличающихся активностью антиоксидантных ферментов (АОФ). По оси ординат – интенсивность ГЗТ в процентах

Таким образом, установлено, что динамика формирования гуморального и клеточного иммунитета против штаммов *C. albicans*, отличающихся активностью антиоксидантных ферментов, своеобразна. Несмотря на то, что в начальные сроки после заражения наблюдали повышение интенсивности иммунного ответа против штамма, обладающего минимальной активностью антиоксидантных ферментов, то в отдаленные сроки интенсивность иммунного ответа оказалась сравнительно низкой в отличие от штамма, обладающего максимальной активностью этих ферментов.

Механизм такой особенности динамики иммунного ответа против штаммов, отличающихся активностью антиоксидантных ферментов, можно объяснить ролью этих ферментов в инфекционном процессе. Известно, что указанные ферменты микроорганизмов имеют определенное значение в фагоцитозе. Ослабляя кислородозависимый киллинг внутри фагоцитов, эти ферменты обеспечивают персистенцию микроорганизмов в организме. С другой стороны, известно, что формирование иммунного ответа связано с процессингом антигенов антипрезентирующими клетками. Слабый киллинг микроорганизмов с высокой активностью антиоксидантных ферментов задерживает их процессинг, в результате чего интенсивность иммунного ответа против такого штамма будет слабой. Такой случай может способствовать более интенсивному размножению указанного штамма в организме и поэтому, в последующие периоды инфекционного процесса, наблюдается более интенсивный иммунный ответ.

ВЫВОДЫ

Внутриклеточные антиоксидантные ферменты – каталаза и СОД *C. albicans*, обеспечивают относительно высокую выживаемость внутри макрофагов, более высокую обсемененность внутренних органов белых мышей, а также более интенсивный иммунный ответ при экспериментальной инфекции. По указанному механизму эти ферменты могут играть роль фактора патогенности *C. albicans* в инфекционном процессе.

ЛИТЕРАТУРА

1. Babior B.M. Phagocytes and oxidative stress. // Am. J. Med. – 2000. – Vol. 109, №1 – P.33-44.
2. Fridovich I. Superoxide anion radical (O₂⁻), superoxide dismutases, and related matters // JBC Online. – 1997. – Vol.30, № 272. – P. 18515-18517
3. Knight J.A. Review: Free radicals, antioxidants, and the immune system // Ann. Clin. Lab. Sci. – 2000. – Vol. 30, №2. – P.145-58.
4. Иммунологические методы / под ред. Г.Фримеля, пер. с нем. – М.: Медицина, 1987. – 472 с.

Поступила в редакцию журнала 07.05.08

Рецензент: А.Е. Учеваткина

