Література

1. Белецкая О.М. Патогенез и перспективы лечения синдрома низкого трийодтиронина при нетиреоидных заболеваниях (научный обзор) // Труды Харьков. ин–та усовершенств. врачей. – Харьков, 1992. – С. 84.

2. Щитовидная железа. Фундаментальные аспекты / Под ред. проф. А.И. Кубарко и проф. Yamashita. – Минск – Нагасаки: 1998. – 368 с.

3. Schimmel M., Utiger R.D. Thyroidal and peripheral production of thyroid hormones // Ann. Intern. Med. – 1997. – V. 87. – P. 760.

4. Эндокринология / Под ред. Н. Лавина: Пер. с англ. – М.: Практика, 1999. – 1128 с.

5. Girvent M., Maestro S., Hernandez R., Carajol I. Euthyroid sick syndrome, associated endocrine abnormalities, and outcome in elderly patients undergoing emergency operation // Surgery. – 1998. – V. 123, N 5. – P. 560-567.

KYSBALANCE кF THYRкIK GLANK HкRMкNES IN CHILKREN WITH ACUTE INTESTINAL INFECTIкNS

I.V. Bohadelnikov, N.V. Rymarenko, A.V. Bobryshova

SUMMARY. The article presents the data to be obstained at the examination of the level of thyroid gland hormones in 65 children with acute intestinal infections of different etiology. It was revealed that in conditions of intestinal toxicosis development the dysbalance of thyroid hormones formed not to be complicated by clinical symptoms of thyroid gland dysfunction in children.

© Колектив авторів, 2004
УДК 579.244.63:576.8.095.38

Г.Н. Кременчуцький, С.І. Вальчук, А.К. Толстанов, Муаммар Киван Ахмед, С.А. Риженко

ГЕТЕРОГЕННІСТЬПОПУЛЯЦІЇAERкCкCCUSVIRIKANS

Дніпропетровська державна медична академія,
Інститут мікробіології та імунології ім. І.І. Мечникова (м. Харків)

Методами фазово-контрастної й електронної мікроскопії показані морфологічні й ультраструктурні зміни клітин Aerococcus viridans, що втратили здатність до окислення лактату та продукування пероксиду водню. У культурах мутантів виявлений підвищений вміст метилгліоксалю. У клітин мутанту різко знижена резистентність до антибіотиків пеніцилінового ряду і значно підвищена стійкість до лізоциму. Реверсія мутантів у початкові форми супроводжується відновленням ультраструктури і всіх біологічних властивостей мікроорганізму. Відсутність активності НАД-незалежної лактатдегідрогенази і накопичення в культурах морфологічних мутантів аерококів метилгліоксалю дозволяє пов'язати ці явища з морфологічною трансформацією аерококів, тому що метилгліоксаль є інгібітором біосинтезу поліамінів і автоінгібітором бактерій.

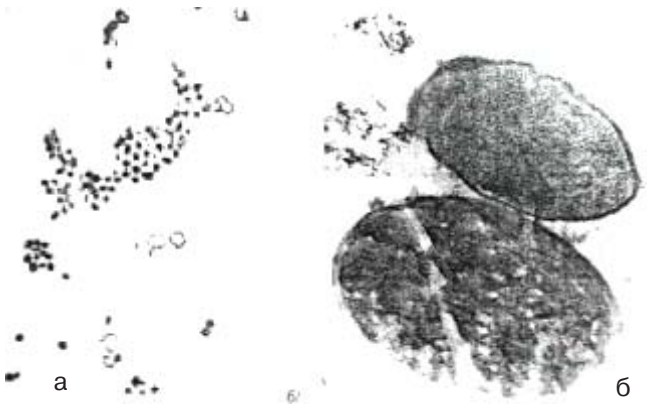
Aerococcus viridans – мікроорганізм, виявлений у повітрі житлових приміщень [1], і є представником нормальної мікрофлори людини і тварин; антагоністично активний до ряду груп патогенних бактерій.

Антагоністична активність аерококів зумовлена екскрецією бактерицидних концентрацій пероксиду водню [2, 3] у результаті функціонування НАД-незалежної лактатдегідрогенази, а також речовини ліпопротеїнової природи, антагоністична дія якої блокується каталазою [4].

У популяції аерококів спостерігаються гетероморфні клітини (мал. 1).

Раніше було встановлене спонтанне утворення атипових колоній у природних розсівах *A. viridans*, чисті культури з яких були поліморфними, не продукували пероксиду водню і були позбавлені антагоністичних властивостей *in vitro*. Чисті культури з атипових колоній зберігали «нові» властивості протягом тривалих пересівань, що дозволило їх віднести до морфофункціональних (МФ) мутантів.

Мутантні варіанти за певних умов реверсували, відновлюючи усі властивості початкового штаму [5]. Водночас тонка будова клітин аерококів та їх варіантів, що утворюються при функціональній зміні початкового штаму, практично не вивчена.



Мал. 1. Гетероморфізм клітин *A. viridans*:
а – фазово-контрастна мікроскопія х3600;
б – електронна мікроскопія х120000.

Мета дослідження – порівняльне вивчення морфологічних, біологічних та ультраструктурних особливостей початкових культур аерококів, що продукують пероксид водню, мутантного варіанту з порушенням продукції пероксиду водню і його ревертантів.

Матеріали і методи

Об'єктами дослідження були штами аерококів: *A. viridans* 167 реп.; *A. viridans* 308 н/а, отриманий з негемолітичної колонії в природному розсіві штаму 167 реп. на 3 % кров'яному агарі; ревертант із переважно вираженою оксидазною активністю – 308 окс. рев.; ревертант із переважно вираженою редуктазною активністю – 308 ред. рев. Вид переважної активності ревертантів оцінювали на індикаторному середовищі певного біохімічного складу [6].

Оцінку антагоністичної активності аерококів проводили за допомогою тест-культур каталазонегативного штаму *Vibrio NAG* р-6078 і каталазопозитивного штаму *E. coli* АВ 1157. Показником антагоністичної активності аерококів служили зона пригнічення росту тест-культур після запилення їх суспензіями добових штрихів росту культур аерококів.

Визначення метилгліоксалю в штамах аерококів проводили при вирощуванні культур у рідкому середовищі [2], що у якості попередників метилгліоксалю містить глюкозу, дигідроксиацетон, α-гліцерофосфат або треонін у концентраціях по 100 мкг/мл.

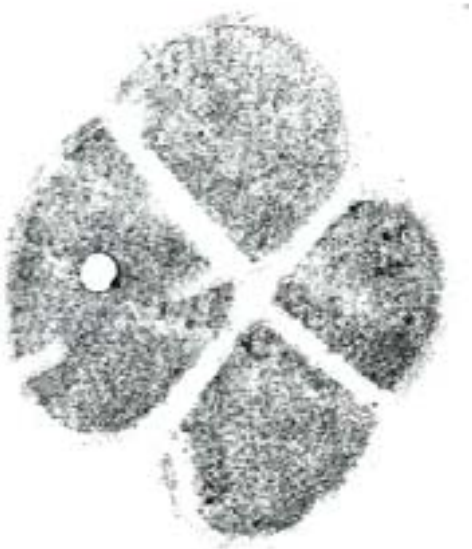
Виділення НАД-незалежної лактатдегідрогенази і визначення її активності проводили за раніше опублікованим методом [7]. Визначали також вміст пероксиду водню в культуральних рідинах аерококів [8]. Білок визначали біуретовим методом. Фазово-контрастне дослідження морфології культур аерококів проводили за допомогою мікрокамер.

Для електронно-мікроскопічного дослідження культури початкового штаму і ревертантів вирощували протягом 24 год на МПА при 37 °С. Культуру мутанту вирощували за тих самих умов на МПА з додаванням 10 % кінської сироватки і на збідненому за нативним білком середовищі [9].

Колонії разом зі шматочком агару вирізували, фіксували 1 % глутаровим альдегідом на 0,15 М фосфатному буфері (pH 7,4) протягом 2 год при кімнатній температурі, триразово відмивали тим же буфером і дофіксовували 1 % OsO_4 протягом 18 год при тій же температурі. Зневоднення, заливання в епоксидні смоли і мікроскопію здійснювали за відомими методами [10].

Результати досліджень та їх обговорення

Дослідження морфології клітин було проведено у фазово-контрастному мікроскопі з використанням мікрокамер і паралельно за допомогою ультратонких зрізів. При фазово-контрастній мікроскопії штамів *A. viridans* спостерігалися в основному округлі кокоподібні клітини (мал. 1а). При перегляді тієї ж культури в електронному мікроскопі також виявлені коки з гомогенною клітинною стінкою товщиною 40-45 нм (мал. 1б). Пошаровість клітинної стінки слабка, цитоплазматична мембрана виявлялася погано, цитоплазма була більш-менш рівномірно заповнена рибосомами і мала досить високу електронну щільність. У цитоплазмі добре помітні невеликі зони нуклеоїду і гранули волютину, що, випаровуючись під пучком електронів, мали вигляд світлої вакуолі, обмеженої трьохшаровою мембраною. Поділ клітин відбувався шляхом утворення поперечних перегородок, у результаті чого формувалися 4 дочірні клітини (мал. 2).



Мал. 2. Електронограма початкового штаму аерококу х120 000.

При перегляді культури мутанту *A. viridans* 308 н/а, який не продукує пероксиду водню, як у фазовому контрасті, так і в електронному мікроскопі, відзначалися суттєві зміни морфології й ультраструктури клітин порівняно з клітинами початкового штаму. Виросліклітини на МПА з 10 % кінською сироваткою як у світловому, так і в електронному мікроскопі мали не кокоподібну, а подовжену, іноді чітко бацилярну, нерідко подовжено-грушоподібну форму (мал. 3а, 3б). На відміну від клітин початкового штаму, у клітин мутанту спостерігалася мікрокапсула, що відходила від поверхні клітинної стінки у вигляді коротких ворсинок і кущиків. Клітинна стінка не була всюди гомогенною. У деяких ділянках пошаровість проглядалася краще. У цитоплазмі закономірно виявлялися мембранні структури ламелярного типу, звичайно розташовані в місцях утворення продукту, що мав високу електронну щільність. Подальша ідентифікація гіперпродукції метилгліоксалю клітинами мутантів унаслідок порушення лактатоксидазної функції дозволяє припускати його концентрацію в електронно-щільних зонах. Морфологічні зміни клітин мутанту чіткіші на середовищі, збідненому нативним білком. У препаратах цієї культури, переглянутої у світловому мікроскопі, кокоподібні клітини траплялися рідше, частішими були клітини грушоподібної, гантелеподібної і булавоподібної форм (мал. 3а).

При електронно-мікроскопічному дослідженні виявлено, що гетерогенність культури пояснюється атиповим поділом. Це призводить до утворення подовжених клітин з великою кількістю поперечних перегородок, нерідко асиметрично розташованих (мал. 4). Деякі з дочірніх сегментів мали більший розмір, набуваючи булавоподібної або гантелеподібної форми. Структура клітинної стінки такої культури була подібна до структури стінки мутанту, описаної вище.

а б

Мал. 3. Ультраструктура *A. viridans* 308 н/а:
а – фазово-контрастна мікроскопія х3 600;
б – клітини того ж морфофункціонального мутанту при електронній мікроскопії х100 000.

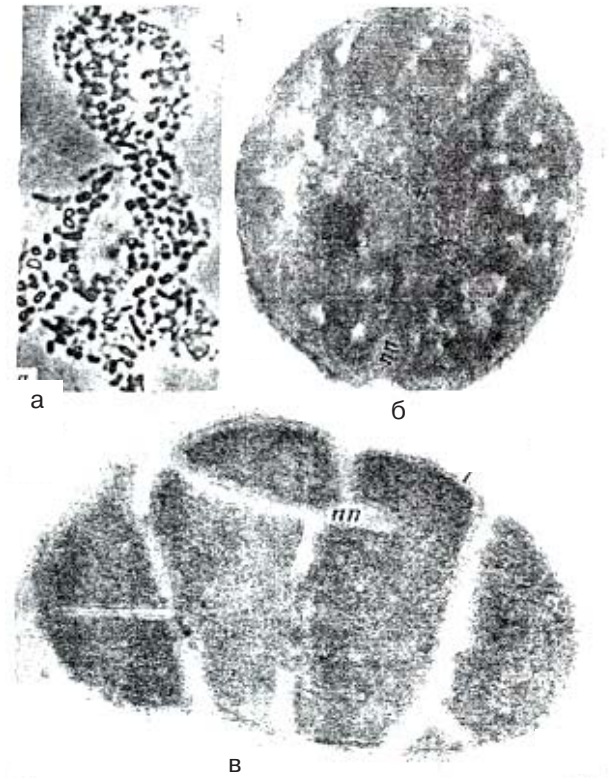
Мал. 4. Порушення поділу в МФМ. Електронна мікроскопія х100 000.

Цитоплазма клітин, особливо в окремих сегментах, мала високу електронну щільність; зони нуклеоїду та внутрішньоцитоплазматичних мембранних структур не виявлялися. Поза клітинами виявлені кристалоподібні структури округлої або гексагональної форми, що мали високу електронну щільність і певну періодичність.

У культур ревертантів, особливо в оксидазного варіанту, що продукує підвищену кількість пероксиду водню, відновлювалася форма і структура клітин (мал. 5а, 5б, 5в). У клітин редуктазного варіанту зі слабкою продукцією пероксиду водню на поверхні клітинної стінки ще зберігалася невеличка мікрокапсула, а клітини ділилися шляхом утворення як симетричних, так і асиметричних перегородок. Навіть коли клітини ділилися на 4 частини, дочірні сегменти були неоднакові за розміром.

Морфологічні й ультраструктурні особливості початкової культури аерокока, мутанта і ревертантів, очевидно, є наслідком змін біологічних властивостей. Для встановлення цього зв'язку було проведено порівняльне вивчення ряду властивостей культур аерококів.

Був вивчений вплив на описані культури аерококів деяких антибіотиків, що діють на основні шляхи біосинтезу клітинної стінки (табл. 1).



Мал. 5. Ультраструктура ревертантів *A. viridans*: а, б – клітини оксидазного ревертанту, х2 500 і х90 000; в – клітина редуктазного ревертанту, х90 000.

Як видно з таблиці, клітини мутанту, на відміну від клітин початкової культури, високочутливі до дії пеніциліну, оксациліну, метициліну і стійкі до дії лізоциму. У ревертантів більшою або меншою мірою спостерігається відновлення початкових властивостей.

Було встановлено, що зникнення антагоністичної активності в мутантів пов'язане з відсутністю продукції пероксиду водню внаслідок втрати активності НАД-незалежної лактатдегідрогенази (ЛДГ) (табл. 2).

Біосинтез лактату в досліджуваних культур аерококів відбувається з метилгліоксалю за допомогою гліоксалаз. Відсутність окислення лактату в неактивного мутанту призводить до накопичення метилгліоксалю, що є інгібітором біосинтезу поліамінів, що регулюють поділ клітин [5, 11].

Найбільша концентрація метилгліоксалю накопичується в культурах мутанту аерококу, що не продукує пероксид водню, особливо при введенні в середовище α-гліцерофосфату. Привертає увагу підвищене накопичення метилгліоксалю при введенні в середовище треоніну в культурі редуктазного ревертанту, що цілком не відновлює початкову морфологію.

У літературі є подинокі повідомлення, що пов'язують морфологічні зміни клітин без порушення цілісності клітинної стінки з функціональними змінами.

Зниження рівня супероксидної дисмутази в культурах *Campylobacter jejuni* АТС 29428 веде до

Таблиця 1

Чутливість штамів аерококів до пеніцилінів і лізоциму

Штам	Мінімальна пригнічувальна концентрація антибіотиків, мкг/мл			
	пеніцилін	оксацилін	метицилін	лізоцим
167 реп ^{г}	125	500	3,84	61,44
308 н/а	0,12	0,12	0,12	2500
308 окс. рев.	125	125	0,12	3,84
308 ред. рев.	125	125	1,92	7,68

Таблиця 2

Біологічна активність штамів аерококів (M±m)

Штам	Показники біологічної активності			
	діаметр зони пригнічення росту вібріону, мм	діаметр зони пригнічення росту *E. coli*, мм	активність ЛДГ, од./мг білка ензиму	накопичення пероксиду водню в бульйоні, ммоль
167 реп.^{г}	37,2±3,4	5,0±1,2	714±15	0,3±0,06
308 н/а	0	0	0	0
308 окс. рев.	47,5±5,6	12,1±1,2	1112±87	4,2±0,8
308 ред. рев.	30,2±5,1	15,7±4,3	231±21	0,08±0,001

накопичення кокоподібних форм [12]. Це вказує на нез'ясовану роль супероксидного радикалу в процесі морфоутворення. Csillag [13] описала кокоподібну трансформацію культур мікобактерій, пов'язавши її з особливими умовами культивування, зокрема зі зміною доступу кисню в культури.

Спостереження про мінливість аерококів відсутні. Одержання і вивчення різноманітних морфологічних варіантів аерококів обговорюється вперше.

Висновок

Відсутність активності НАД-незалежної лактатдегідрогенази і накопичення в культурах морфологічних мутантів аерококів метилгліоксалю дозволяє пов'язати ці явища з морфологічною трансформацією аерококів, тому що метилгліоксаль є інгібітором біосинтезу поліамінів і автоінгібітором бактерій.

Література

1. Ballester L.M., Ballester M., Belaich J.P. Purification of the viridocine produced by Aerococcus viridans // Antimicrob. Agents Chemother. – 1980. – V. 17, N 5. – P. 784-788.

2. Ballester L.M., Ballester M., Belaich J.P. Viridocine: a bactericine from Aerococcus viridans // Ann. Microbiol. – 1977. – V. 128. – P. 393-400.

3. Новый пробиотик А-бактерин / Под ред. Г.Н. Кременчуцкого. С.А. Рыженко. – Днепропетровск: Пороги, 2001. – 252 с.

4. Кременчуцкий Г.Н. Биологические особенности А-бактерина // Медичні перспективи. – 2001. – Т. 6, № 3. – С. 90-97.

5. Freedberg W.B., Kistler W.S., Lin E.C. Superoxide radicel and Superoxide dismutase // J. Bacteriol. – 1971. – V. 108. – P. 137.

6. А.с. № 1359301 СССР. – Кременчуцкий Г.Н. // Открытия, изобретения. – 1987. – Т. 46. – С. 102.

7. Doelle H.B. Nicotinamide Adenine Dinucleotide-Dependent and Nicotinade Adenine Dinuclotide-Independent lactate dehydrogenage in homofermetative and heterofermentative lactic acid bacteria // J. Bacteriol. – 1971. – V. 108. – N 3. – P. 1284-1289.

8. Государственная фармакопея СССР. – 10-е изд. –М.: Медицина, 1968. – 1079 с.

9. Ferchan R., Krementchoutski G. Recoghition of Aerococus viridaus by the clinical microbiologist // Abstr. Papers Sixth Scientific Konference. Kabul University. – 1987. – P. 135.

10. Алексеев В.С. Методика электронно-микроскопического исследования // Укр. биохим. журн. – 1987. – Т. 59. – С. 88.

11. Cornall A.G., Bardawill C.J., David M.M. Eradication of endemic methicillin-resistant S-aureus infectious from a neonatal intensive care unit // J. Biol. Chem. – 1949. – V. 177. – P. 751.

12. Moran A.P., Upton M.E. Protein measurement with Folin phenol reagent // J. Appl. Bacteriol. – 1987. – V. 62. – P. 43.

13. Williams R.E., Hirch A., Cowan S.T. Aerococcus – a new bacterial genus // J. Gen. Microbiol. – 1953. – V. 8. – P. 475.

HETERкGENEITY кF AERкСкCCUS VIRIKANS PкPULLATIкN

H.N. Kremenchutsky, S.I. Valchuk, A.K. Tolstanov, Muammar Kivan Akhmed, S.A. Ryzhenko

SUMMARY. The techniques of phase-contrast and electronic microscopy were used to demonstrate the morphological and ultrastructural modifications of Aerococcus viridans cells which had lost the ability to oxidise lactate and to produce hydrogen peroxide. It was revealed the increased level of methyl glyoxal in the cultures of mutants. In the cells of mutants the resistance to antibiotics of penicillin group is sharply lowered and the stability to lysozyme is significantly increased.

The accumulation of methyl glyoxal which inhibits the synthesis of polyamines, regulators of cell division, is coupled with the following morphological modifications of A. viridans: polymorphism, cell elongation with the formation of numerous asymmetric cross partitions, and the appearance of lamellar membrane structures at sites where the electron-dense product is accumulated. This correlation has opened up the new approaches to the study of bacterial morphological modifications.