

А.З. Пепоян, Н.С. Мирзоян, М.О. Саакян, Л.А. Киракосян,
академик К.Г. Карагезян

Некоторые особенности антиокислительной системы бактериальных штаммов *Escherichia coli* G35

(Представлено 10/IV 2001)

О ведущей роли реакций свободнорадикального окисления липидов биологических мембран, называемых также реакциями перекисного окисления липидов (ПОЛ), первоначально говорилось в связи с двумя патологическими состояниями: лучевой болезнью и злокачественным ростом. В последующие годы список патологий, в патогенезе которых предполагали вовлечение активности процессов ПОЛ, существенно расширен [1,2]. Вывод об участии процессов ПОЛ в возникновении и развитии разных патологических состояний организма был сделан на основе способности ингибиторов свободнорадикального окисления различной химической природы в той или иной мере предупреждать или ограничивать повреждения, характерные для данных патологий.

Ранее нами было показано, что штаммы *E.coli* G35 N49 и *E.coli* G35 N61 из кишечной микрофлоры человека [3] отличаются некоторыми физико-химическими параметрами мембран клеток, включая также качественный и количественный состав фосфолипидов (ФЛ) этих клеток и др.

Целью настоящей работы явилось изучение процессов ПОЛ, пероксидазной и каталазной активности бактериальных штаммов *E.coli* G35 N49 и *E.coli* G35 N61.

Об активности ПОЛ судили по содержанию малонового диальдегида (МДА), образующего реакцию окрашивания с тиобарбитуровой кислотой, интенсивность которого регистрировали спектрофотометром СФ-4А при длине волны 535 нм. Количество перекисей пересчитывали на 1 мл фосфора данной суспензии. Количество фосфора определялось при изучении ФЛ состава клеток [4].

Для определения интенсивности ПОЛ в клеточных жидкостях после роста штаммов *E.coli* в стационарной фазе роста в питательном бульоне клетки удалялись из бульона и измерялась активность ПОЛ как в клеточной суспензии и клеточном экстракте, так и в 0.2 мл объеме бульона.

Известно, что фермент НАДН-цитрохром С-редуктаза является начальным звеном перекисного окисления ненасыщенных жирных кислот, поэтому количество МДА нами определялось как в аскорбат-зависимой системе, так и в НАДФ.Х-зависимой системе перекисления.

Пероксидазную активность определяли по методу [5]. В качестве окисляемого субстрата использовался пирогаллол, который окислялся в пурпурогалин с максимумом поглощения 430 нм. Измерения оптической плотности проводили на спектрофотометре СФ-46.

Исследуемый раствор содержал 0.8 мл 0.006 М натрий-фосфатного буфера рН-6,8; 0.12 мл ферментной вытяжки (суспензия, экстракт или культуральная жидкость); 0.5 мл 0.15%-ной H_2O_2 ; 1.1 мл H_2O и 0.5 мл 0.003 М пирогаллола. В контроле вместо H_2O_2 добавляли 0.5 мл

H₂O.

Активность фермента определяли по следующей формуле:

$$A = D_{t_2} - D_{t_1} / (t_2 - t_1)c,$$

где A - активность фермента, D - оптическая плотность, t - время (с), c - концентрация. Измерения проводили в течение 2.5-3 мин.

Каталазную активность бактериальных штаммов E.coli G35 определяли по методу [6], основанному на том, что две молекулы H₂O₂ разлагаются на 2H₂O + O₂. Избыток перекиси титруют перманганатом в кислой среде. В опыте определяли количество оставшейся неразрушенной перекиси водорода, а в контроле - общее количество взятой H₂O₂ в присутствии каталазы, инактивированной кипячением. Вычитывая результаты опыта из результатов контроля, определяли количество разрушенной за определенное время (30 мин) перекиси, что дает возможность судить об активности каталазы.

Для проверки полученных данных был использован статистический метод Стюарта - Фишера. В обеих НАДФ.Н- и аскорбат-зависимых системах переоокисления исследуемые штаммы E.coli G35, преобладающие как в кишечной микрофлоре здоровых людей (E.coli G35 N61), так и в кишечнике больных раком (E.coli G35 N49), показали одинаковую интенсивность ПОЛ. В табл. 1 представлен процесс ПОЛ НАДФ.Н-зависимой системы переоокисления клеток E.coli G35. Данные таблицы свидетельствуют также о наличии интенсивности ПОЛ как в клеточной суспензии и клеточном экстракте, так и в культуральных жидкостях обоих типов E.coli G35. При этом, однако, выявлено, что если уровень ПОЛ в исследуемых клетках E.coli в клеточных экстрактах одинаков, то он различается в клеточных суспензиях и культуральных жидкостях.

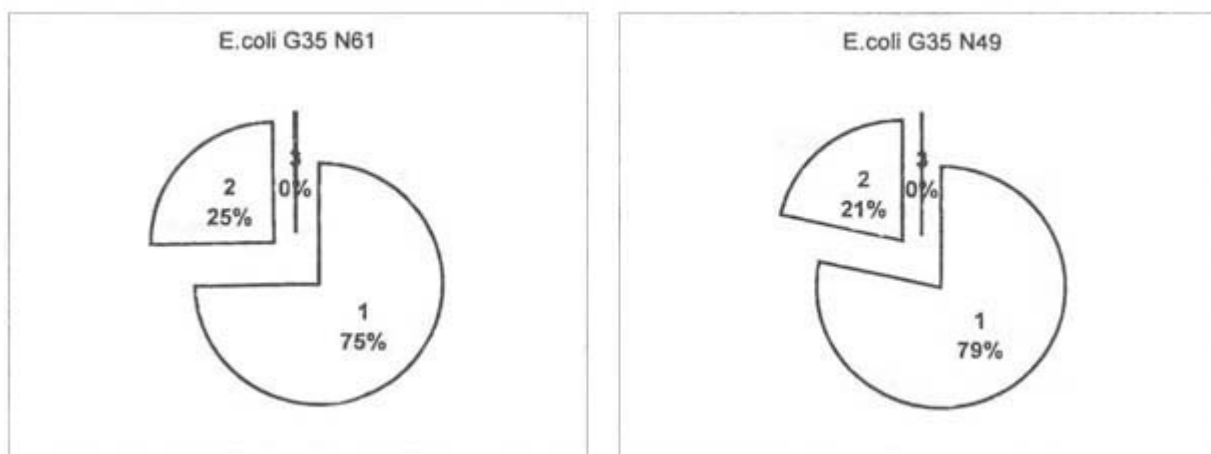
Сохранение одинаковой активности ПОЛ в клеточных экстрактах штаммов E.coli, по-видимому, способствует поддержанию определенного метаболического статуса обоих типов исследуемых клеток E.coli, в то время как изменения уровня процессов ПОЛ в клеточных суспензиях и культуральных жидкостях может влиять на формирование патологических состояний больных раком людей.

Таблица 1

Процесс перекисного окисления липидов клеток Escherichia coli G35

Бактериальные штаммы	Количество малонового диальдегида на 1 мг фосфора		
	Клеточная суспензия	Клеточный экстракт	Культуральная жидкость *
E.coli G35 N61	121.3±2.4	40.72±1.05	0.625±0.08
E.coli G35 N49	150.74±1.75	40.65±2.21	0.171±0.06

* Абсолютные показатели количества МДА по СФ без пересчета на 1 мг фосфора.



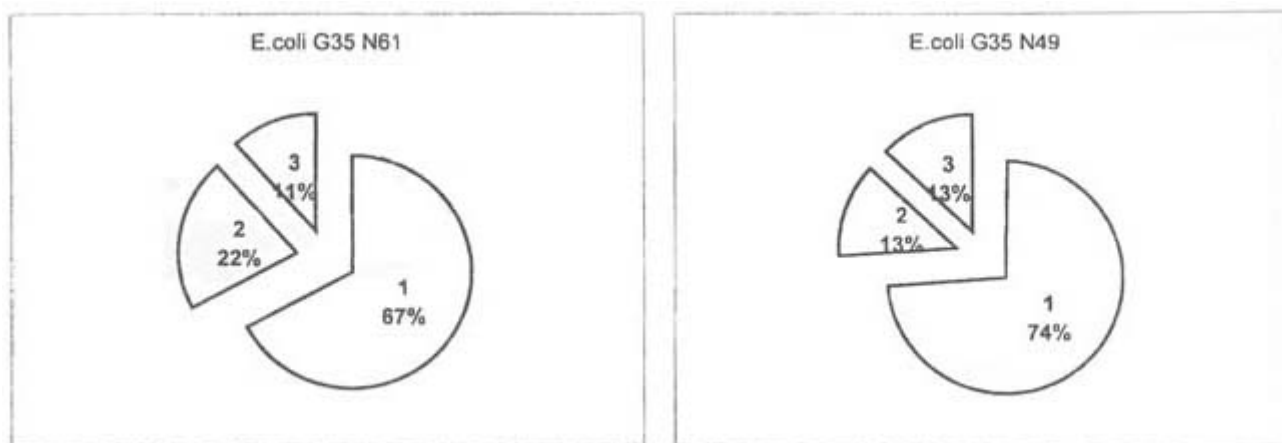
Окисление липидов мембран, как доказано многочисленными экспериментами, подчиняется законам жидкофазного окисления органических веществ. Среди ФЛ при перекисидации больше всего разрушаются фосфатидилэтаноламины и фосфатидилхолины, что несомненно отражается на конечной концентрации этих ФЛ в мембранах исследуемых штаммов *E. coli* [7].

Как известно, пероксидазы являются антиоксидантами ферментами, одной из основных функций которых является разрушение опасных для жизнедеятельности клеток пероксидов. Результаты по изучению пероксидазной активности штаммов *E. coli* приведены в табл. 2, из которой явствует, что изученные штаммы отличаются также пероксидазной активностью. Показано, что в клеточных суспензиях как у *E. coli* G35 N61, так и у *E. coli* G35 N49 наблюдается максимальная активность фермента (соответственно $0.233 \times 10^{-3} \pm 0.01$ и $0.169 \times 10^{-3} \pm 0.01 \text{ с}^{-1} \text{ мг}^{-1}$). Установлено также существенное различие уровня пероксидазной активности штаммов *E. coli* G35 N61 и *E. coli* G35 N49 в клеточных экстрактах (соответственно $0.075 \times 10^{-3} \pm 0.01$ и $0.030 \times 10^{-3} \text{ с}^{-1} \text{ мг}^{-1}$).

Таблица 2

Пероксидазная активность клеток *Escherichia coli*

Бактериальные штаммы	Уровень пероксидазной активности ($\text{с}^{-1} \text{ мг}^{-1}$) ¹⁾		
	Клеточная суспензия	Клеточный экстракт	Культуральная жидкость
<i>E. coli</i> G35 N61	$0.233 \times 10^{-3} \pm 0.01$	$0.075 \times 10^{-3} \pm 0.01$	$0.04 \times 10^{-3} \pm 0.01$
<i>E. coli</i> G35 N49	$0.169 \times 10^{-3} \pm 0.01$	0.03×10^{-3}	$0.03 \times 10^{-3} \pm 0.01$



Каталазная активность у штаммов *E.coli* отсутствует, что характерно для бактериальных клеток *E.coli* [8].

По литературным данным, изменения состояния ПОЛ и активности ряда ферментов антиокислительной системы влияют на вязкость мембран, и в связи с этим изменяется и проницаемость мембраны бактериальных клеток. Процесс повреждения мембран может сопровождаться выходом некоторых ферментов в надосадочную жидкость, что, в свою очередь, может быть причиной интенсификации процессов ПОЛ в культуральных жидкостях штаммов *E.coli* G35 [8].

Все вышеупомянутое свидетельствует о различии процессов ПОЛ и пероксидазной активности штаммов *E.coli* G35, что может иметь влияние как на смену и сборку мембранных белков и регуляцию активности отдельных мембранных протеинов, так и на общий метаболический статус организма.

Таким образом, установлено, что клеточные стенки и цитоплазматические мембраны *E.coli* G35, характерные для здоровых и больных раком людей, значительно отличаются как по ФЛ составу, так и по некоторым особенностям антиокислительной системы.

Институт молекулярной биологии НАН РА

Литература

1. Козлов Ю.П., Качан В.Е. Молекулярные механизмы повреждения кислородом системы транспорта кальция в саркоплазматическом ретикулуме мышц. Иркутск. 1983.
2. Wendel A., Reiter R. Oxygen Radicals in Chemistry and Biology. Proc. Int. Conf. 3-rd. Eds. W.Bras, M.Saran, Traid D. Berlin. 1984. P. 345-349.
3. Карапетян А.О. Биологический антагонизм некоторых представителей кишечной микрофлоры и опухолевых клеток. Автореф. канд. дис. М. 1987.
4. Саакян М.О, Пепоян А.З., Киракосян Л.А., Епископосян А.Р., Карапетян А.О., Шагинян А.А., Карагезян К.Г. - ДНАН Армении. 1999. Т.99. N 4. С. 362-366.
5. Кушманова О.Д., Иванченко Г.М. Руководство к лабораторным занятиям по биологической химии. М. Медицина. 1983.
6. Асатиани В.С. - Ферментные методы анализа. М. 1969. С. 611-612.
7. Пероуян А.З., Kirakossyan L.N., Shahinian A.A., Karageuzian K.G. - HABS. ISFOS. 1999. Japan.
8. Берги. Краткий определитель бактерий. Под ред. Хоуста Дж. М. Мир. 1980.

Ա.Զ. Փեփոյան, Ն.Ս. Միրզոյան, Մ.Օ. Սահակյան, Լ.Հ. Կիրակոսյան,
ակադեմիկոս Կ.Գ. Ղարազյոզյան

**Escherichia coli G35 բակտերիալ շտամների հակաօքսիդացիոն համակարգի
որոշ առանձնահատկությունները**

Ուսումնասիրվել են մարդու աղիքային միկրոֆլորայի E.coli G35 բակտերիալ շտամների լիպիդային պերօքսիդացիոն պրոցեսների (ԼՊՊ), ինչպես նաև պերօքսիդազային և կատալազային ակտիվության որոշ առանձնահատկությունները:

Ցույց է տրվել, որ առողջ և քաղցկեղով հիվանդ մարդկանց աղիքային միկրոֆլորայում գերակշռող համապատասխանաբար E.coli G35 N61 և E.coli G35 N49 շտամների մոտ ՆԱԴՖ. H և ասկորբատ-կախյալ պերօքսիդացիոն համակարգերում ԼՊՊ-ի մակարդակը մնում է անփոփոխ:

Պարզվել է, որ վերոհիշյալ պերօքսիդացիոն համակարգում հետազոտվող բակտերիաների էքստրակտներում, ի տարբերություն բջջային սուսպենզիաների և կուլտուրալ հեղուկների, նկատվում է ԼՊՊ-ի ակտիվության միանման մակարդակ:

Ենթադրվում է, որ E.coli G35 շտամների օքսիդացիոն ու հակաօքսիդացիոն համակարգերում նկատվող առանձնահատկությունները կարող են ազդել տեր մակրոօրգանիզմի նյութափոխանակության պրոցեսների վրա: