

УДК 576.852.211:543.866

**ФЕРМЕНТАТИВНА АКТИВНІСТЬ ШТАМІВ *Mycobacterium tuberculosis*,
ВИДІЛЕНИХ ВІД ХВОРИХ НА ТУБЕРКУЛЬОЗ ЛЕГЕНЬ**

Г. Яворська

*Львівський національний університет імені Івана Франка,
вул. Грушевського, 4, м. Львів 79005, Україна,
e-mail: biolog@franko.lviv.ua*

Проведено дослідження наявності деяких основних ферментних систем у штамів мікобактерій туберкульозу. Дослідження п'яти різних за чутливістю до протитуберкульозних препаратів груп штамів *Mycobacterium tuberculosis* показало, що переважна більшість із них мають досліджувані ферментні системи. Лише в групі полірезистентних культур спостерігалось зниження кількості штамів із майже всіма досліджуваними ензимами, крім пероксидази й глюкозо дегідрогенази. Однак глюкозодегідрогеназа виявлялася найрідше серед чутливих і стійких до одного препарату штамів мікобактерій.

Ключові слова: мікобактерії туберкульозу, ферментативна активність.

Останніми роками, на фоні неухильного зростання захворюваності та смертності від туберкульозу, все актуальнішими стають питання вивчення основних біологічних властивостей його збудника [3, 6]. Серед них одними з найважливіших є дослідження стійкості й ферментативної активності мікобактерій туберкульозу [5, 8]. Відомо, що мікобактерії туберкульозу мають активність багатьох різних ферментів [2, 9, 11]. У працях багатьох авторів показано, що саме наявність тих чи інших ферментних систем керує здатністю збудника піддаватися впливу протитуберкульозних препаратів [7, 10, 13, 14]. Вивчаючи каталазної активності різних за стійкістю до протитуберкульозних препаратів культур мікобактерій виявлено, що лабораторні штами *Myc.tuberculosis* (H₃₇R_v і Bovinus 8) стійкі до ізоніазиду й стрептоміцину мають послаблену або від'ємну реакцію на каталазу та пероксидазу [1, 12]. Про амідази й дегідрогенази мікобактерій туберкульозу зустрічаються лише поодинокі дані [9, 11], хоча відомо, що ці ензими відіграють важливу роль у життєдіяльності живих організмів, беручи участь у трофічних функціях і окисно-відновних процесах у клітині. Слід зазначити, що дослідження кореляції між стійкістю та деякими ферментативними активностями проводилося, здебільшого, на лабораторних штамів мікобактерій туберкульозу. Даних про такий взаємозв'язок серед культур виділених від хворих майже не зустрічається.

Метою нашої роботи було дослідити наявність деяких основних ферментних систем у штамів мікобактерій, виділених від хворих на туберкульоз легень у Львівській області, з різною чутливістю до протитуберкульозних препаратів.

Чутливість штамів *Mycobacterium tuberculosis* до протитуберкульозних препаратів визначали методом абсолютних концентрацій на твердих поживних середовищах згідно з методикою, описаною в наказі № 558 Міністерства охорони здоров'я СРСР від червня 1978 року (Москва). Визначення каталазної, пероксидазної, нітратредуктазної та амідазної активностей виділених культур мікобактерій проводили також згідно з рекомендаціями згаданого наказу. Визначення дегідрогеназної активності проводили методом, який описав Савченко [4].

Залежно від кількісної оцінки чутливості до препаратів, досліджені культури були поділені на такі групи: 1 – чутливі; 2 – стійкі до одного; 3 – стійкі до двох; 4 – стійкі до трьох; 5 – стійкі до чотирьох і більше протитуберкульозних препаратів (будь-які досліджені препарати). Дослідження цих груп штамів виду *Mycobacterium tuberculosis*, виділених від хворих на туберкульоз легень показало, що переважна більшість із них мають досліджувані ферментні системи. Однак серед виділених чутливих й стійких до одного антибактеріального препарату штамів мікобактерій лише до 40% містили глюкозодегідрогеназу. Всі інші досліджені штами мали цей фермент. Серед штамів зі стійкістю до двох препаратів виявлено незначне зменшення кількості культур із каталазною й збільшення з глюкозодегідрогеназною активністю, порівняно з попередніми групами штамів. У мікобактерій 4-ї групи зафіксовано зменшення кількості штамів, які мають каталазну, сукцинат- та алкогольдегідрогеназні ферментні системи. В групі полірезистентних штамів спостерігалось зменшення частки культур із наявністю досліджуваних ензимів, крім пероксидази та глюкозодегідрогенази, зменшення активності яких не виявлено (рисунок). Всі проаналізовані групи штамів мікобактерій містили фермент нітратредуктазу, що підтверджує, разом із іншими показниками, їх приналежність до виду *Mycobacterium tuberculosis*.

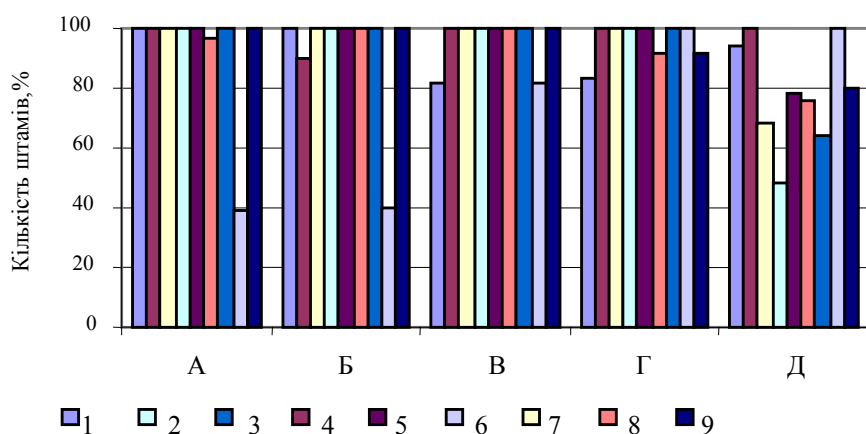
Також досліджено залежність ферментативної активності від якісної оцінки стійкості виділених культур. При цьому виявлено наступні закономірності. Зокрема, (таблиця) незначне зменшення кількості культур із каталазною активністю серед штамів стійких до стрептоміцину, ізоніазиду, етамбутолу та рифампіцину. Пероксидаза виявлялася в усіх досліджуваних культур, крім декількох, стійких до етамбутолу. При дослідженні амідазної активності встановлено, що зі всіх досліджених лише всі чутливі штами мали нікотиназу, піразинамідазу та уреазу. Штами, стійкі до досліджуваних препаратів, не всі містили вказані амідази, як і дегідрогеназні ензими. Так, серед усіх стійких штамів спостерігалось зменшення кількості культур, у яких виявлено сукцинат-, глутамат- й алкогольдегідрогенази. Глюкозодегідрогеназа виявлялася завжди в штамів, стійких до ізоніазиду, канаміцину та рифампіцину.

Отже, у результаті проведених досліджень встановлено, що серед полірезистентних штамів мікобактерій туберкульозу, виділених від хворих, зменшується відсоток культур із наявністю майже всіх досліджуваних ензимів, крім глюкозодегідрогенази, яка виявляється значно частіше саме серед полірезистентних культур.

Не було зафіксовано повної залежності між каталазною і пероксидазною активностями, як зазначають деякі дослідники. Якщо з набуттям стійкості частка культур з активністю каталази зменшується, то для пероксидази такої тенденції не виявлено. Не було також встановлено втрати каталазної й пероксидазної

активності серед стійких до конкретних протитуберкульозних препаратів штамів, що потребує подальших досліджень, можливо, з використанням точного кількісного вимірювання активності даних ензимів.

Проведені дослідження показують, що мікобактерії туберкульозу мають амідазну активність. Хоча певних особливостей амідазних ензимів, залежно від стійкості до тих чи інших досліджених протитуберкульозних препаратів, не спостерігалось, однак отримані результати можуть служити додатковим критерієм при ідентифікації виділених збудників.



Ферментативна активність штамів мікобактерій туберкульозу, різних за чутливістю до протитуберкульозних препаратів (А – чутливі, Б – стійкі до одного, В – стійкі до двох, Г – стійкі до трьох, Д – стійкі до чотирьох і більше препаратів); 1- каталаза; 2 - піразинамідаза; 3 - глутаматдегідрогеназа; 4 - пероксидаза; 5 - сечовина; 6 глюкозодегідрогеназа; 7 - нікотиназа; 8 - сукцинатдегідрогеназа; 9 – алкогольдегідрогеназа

Щодо досліджених дегідрогеназ у мікобактерій туберкульозу, то встановлено, що з набуттям резистентності відсоток культур із наявністю дегідрогеназних ензимів зменшується. Це відбувається приблизно на одному рівні залежно від стійкості до того чи іншого препарату, крім штамів, стійких до канаміцину, де спостерігається найбільше зменшення частки культур із сукцинат-, глутамат- та алкогольдегідрогеназами. Найменший відсоток штамів із наявністю глюкозодегідрогенази зафіксовано серед чутливих культур. Із набуттям стійкості, спостерігається набуття активності цього ензиму, причому незалежно до якого препарату резистентна культура.

Ферментативна активність штамів *Mycobacterium tuberculosis*

Ферментативна активність	Кількість досліджуваних штамів															
	чутливі до прегархів		стійло стрептоміцину		стійло ізоніазиду		стійло етамбутолу		стійло канеміцину		стійло рифампіцину		стійло флуоренциду			
	абс	%	абс	%	абс	%	абс	%	абс	%	абс	%	абс	%		
каталаза	(+)	28	100	62	91,2±3,4	54	90,0±3,9	55	93,2±3,3	21	100	46	93,9±3,4	49	90,7±4,0	
	(-)	0	0	6	8,8±3,4	6	10,0±3,9	4	6,8±3,3	0	0	3	6,1±3,4	5	9,3±4,0	
Пероксидаза	(+)	28	100	68	100	60	100	58	98,3±1,7	21	100	49	100	54	100	
	(-)	0	0	0	0	0	0	1	1,7±1,7	0	0	0	0	0	0	
нікотиніаза	(+)	28	100	50	73,5±5,4	43	71,7±5,8	41	69,5±6,0	13	61,9±10,6	35	71,4±6,5	38	70,4±6,2	
	(-)	0	0	18	26,5±5,4	17	28,3±5,8	18	30,5±6,0	8	38,1±10,6	14	28,6±6,5	16	29,6±6,2	
пірролін-амідаза	(+)	28	100	41	60,3±5,9	34	56,7±6,4	35	59,3±6,4	10	47,6±10,9	28	57,1±7,1	32	59,3±6,7	
	(-)	0	0	27	39,7±5,9	26	43,3±6,4	24	40,7±6,4	11	52,4±10,9	21	42,9±7,1	22	40,7±6,7	
уреаза	(+)	28	100	57	83,8±4,5	49	81,7±5,0	49	83,1±4,9	15	71,4±9,9	39	79,6±5,8	45	83,3±5,1	
	(-)	0	0	11	16,2±4,5	11	18,3±5,0	10	16,9±4,9	6	28,6±9,9	10	20,4±5,8	9	16,7±5,1	
сукцинатдегідрогеназа	(+)	27	96,4±3,5	55	80,9±4,8	48	80,0±5,2	47	79,7±5,2	15	71,4±9,9	38	77,6±6,0	43	79,6±5,5	
	(-)	1	3,6±3,5	13	19,1±4,8	12	20,0±5,2	12	20,3±5,2	6	28,6±9,9	11	22,4±6,0	11	20,4±5,5	
глютаматдегідрогеназа	(+)	28	100	50	73,5±5,4	43	71,7±5,8	43	72,9±5,8	11	52,4±10,9	31	63,3±6,9	37	68,5±6,3	
	(-)	0	0	18	26,5±5,4	17	28,3±5,8	16	27,1±5,8	10	47,6±10,9	18	36,7±6,9	17	31,5±6,3	
глюкозодегідрогеназа	(+)	11	39,3±9,2	61	89,7±3,7	60	100	56	94,9±2,9	21	100	49	100	54	100	
	(-)	17	60,7±9,2	7	10,3±3,7	0	0	3	5,1±2,9	0	0	0	0	0	0	
алкогольдегідрогеназа	(+)	28	100	57	83,8±4,5	50	83,3±4,8	49	83,1±4,8	14	66,7±10,3	39	79,6±5,8	45	83,3±5,1	
	(-)	0	0	11	16,2±4,5	10	16,7±4,8	10	16,9±4,8	7	33,3±10,3	10	20,4±5,8	9	16,7±5,1	

Примітка: (+) наявність ферментативної активності; (-) відсутність ферментативної активності.

1. *Афанасьева Ю.П., Загоржинский П.Ю.* Биологические свойства селекционированных лекарственно-устойчивых штаммов микобактерий туберкулеза // Пробл. туберкулеза. 1978. №10. С. 65–70.
2. *Вейсфейлер Ю.К.* Биология и изменчивость микобактерий туберкулеза и атипичные микобактерии. Будапешт, 1975.
3. *М'ясликов В.Г.* Сучасні медико-соціальні аспекти туберкульозу // Сучасні інфекції. 1999. №1. С. 9–11.
4. *Савченко П.Е.* Лабораторная диагностика туберкулеза животных. Чернигов, 1998.
5. *Фещенко Ю.І., Мельник В.М.* Епідеміологічна ситуація з туберкульозу в Україні та діяльність протитуберкульозної служби. // Укр.пульмонол. журн. 1997. №3. С. 5–8.
6. *Хоменко А.Г.* Туберкулез как международная проблема. // Пробл. туберкулеза. 1991. №1. С. 3–6.
7. *Kelley C.L., Rouse D.A., Morris S.L.* Analysis of *ahpC* gene mutations in isoniazid-resistant clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*.// *Antimicrobial Agents & Chemotherapy*. 1997. Vol.41(9). P. 2057–2058.
8. *Manca C., Paul S., Barry C.E 3rd., Freedman V.H., Kaplan G.* *Mycobacterium tuberculosis* catalase and peroxidase activities and resistance to oxidative killing in human monocytes in vitro // *Infection & Immunity*. 1999. Vol.67(1). P. 74–79.
9. *Ohman R., Ridell M.* Purification and characterisation of isocitrate dehydrogenase and malate dehydrogenase from *Mycobacterium tuberculosis* and evaluation of their potential as suitable antigens for the serodiagnosis of tuberculosis // *Tubercle & Lung Disease*. 1996. Vol.77(5). P. 454–461.
10. *Ohno H., Koga H., Kohno S.* Multidrug-resistant tuberculosis. 2. Mechanisms of drug-resistance in *Mycobacterium tuberculosis*--genetic mechanisms of drug-resistance // *Kekkaku*. 1998. Vol.73(11). P. 657–663.
11. *Raynaud C., Etienne G., Peyron P. et. al.* Extracellular enzyme activities potentially involved in the pathogenicity of *Mycobacterium tuberculosis*.// *Microbiology*. 1998. Vol.144 (Pt2). P. 577–587.
12. *Rouse D.A., DeVito J.A., Li.Z., Byer H., Morris S.L.* Site-directed mutagenesis of the *katG* gene of *Mycobacterium tuberculosis*: effects on catalase-peroxidase activities and isoniazid resistance // *Molecular Microbiology*. 1996. Vol.22(3). P. 583–592.
13. *Saint-Joanis B., Souchon H., Wilming M., Johnsson K., Alzari P.M., Cole S.T.* Use of site-directed mutagenesis to probe the structure, function and isoniazid activation of the catalase/peroxidase, KatG, from *Mycobacterium tuberculosis* // *Biochemical Journal*. 1999. Vol.338(Pt3). P. 753–760.
14. *Wengenack N.L., Todorovic S., Yu L., Rusnak F.* Evidence for differential binding of isoniazid by *Mycobacterium tuberculosis* KatG and the isoniazid-resistant mutant KatG(S315T) // *Biochemistry*. 1998. Vol.37(45). P. 15825–15834.

ENZYME ACTIVITY OF *Mycobacterium tuberculosis*, ISOLATED FROM TUBERCULOSIS PATIENTS**G. Yavorska**

*Ivan Franko National University of L'viv,
Hrushevskoho st.4, L'viv 79005, Ukraine,
e-mail: biolog@franko.lviv.ua*

A research on *Mycobacterium tuberculosis* with different sensetiveness to antituberculosis medicines to find out some enzyme systems was carried out. The investigation of five different groups of *Mycobacterium tuberculosis* strains organized according to sensetiveness showed that the majority of them has researched enzyme systems. Only in the group of polyresistant cultures, the decrease of almost all enzymes except for peroxidase and glucose dehydrogenase is observed. However, the glucose dehydrogenase bacteria was seen the least amount of times among stable and sensitive to one medicine strains.

Keywords: tuberculosis micobacteria, ensyme activity.

Стаття надійшла до редколегії 21.02.2001
Прийнята до друку 18.04.2001