

Какарюка Анастасия Викторовна, Студент,
Белгородский Государственный Национальный
исследовательский университет, Белгород

Третьяков Влад Олегович, Студент,
Белгородский Государственный Национальный
исследовательский университет, Белгород

Пилюгин Сергей Валерьевич,
Ассистент кафедры микробиологии и вирусологии
с курсом клинической иммунологии, Белгородский Государственный
Национальный исследовательский университет, Белгород

ВЛИЯНИЕ ЛИЗОЦИМА НА СТАФИЛОКОКК И СТРЕПТОКОКК

Аннотация: Авторы анализируют человеческий белок лизоцим. Изучают его ферментативную активность, направленную против грамположительных бактерий и грамотрицательных бактерий. Рассматривают возможность применения лизоцима в качестве эндогенного, врождённого антибиотика. Эта статья посвящена применению лизоцима в медицине (лечение инфекционных заболеваний, заживление ран и борьба с биопленками).

Ключевые слова: лизоцим, стафилококк, стрептококк, антибиотик, антилизоцимная активность

Введение.

Лизоцим представляет собой белок размером ~14 кДа, присутствующий во многих секретах слизистых оболочек (слезы, слюна и слизь) и тканях животных и растений, и играет важную роль во врожденном иммунитете, обеспечивая защиту от бактерий, вирусов и грибов. Он уже давно стал предметом нескольких применений из-за его антимикробных свойств в отношении широкого круга микроорганизмов. Проблема устойчивости к антибиотикам стимулировала поиск новых молекул или новых применений известных соединений. В будущем человечество сможет активно применять данный фермент в медицинских целях, ветеринарии, кормах, консервировании пищевых продуктов и защите сельскохозяйственных культур. Он доступен из широкого круга источников. Как пример - белок куриного яйца, слёзы и другие выделения некоторых видов животных, молоко млекопитающих. Важной задачей сейчас является модификация лизоцима и его синергизм с различными лекарственными средствами.

Морфология. Биохимия. Ферментативная активность.

Лизоцим (второе название: мурамидаза) является белком эндогенного происхождения. Он проявляет ферментативную активность гидролизуя β -1,4-гликозидные связи, находящиеся между N-ацетилмурамовой кислотой (NAM) и N-ацетилглюкозамидом (NAG). Данная реакция гидролиза происходит в полисахаридном участке пептидогликанов клеточной стенки грамположительных бактерий. Пептидогликан состоит из полисахаридных цепей, сшитых короткими пептидами. Полисахаридные цепи содержат чередующиеся звенья NAM и NAG. Пептиды связаны с лактатной частью NAM и обычно состоят из L-аланина, D-изоглутаминовой кислоты (D-изоглутамин у многих грамположительных бактерий), L-лизина или мезо диаминопимелиновой кислоты (у грамположительных и грамотрицательных



бактерий соответственно). И два остатка D-аланина. Пептиды боковых цепей различных полисахаридных цепей связаны между собой прямой связью между мезо-пимелиновой кислотой и первым D-аланином (грамотрицательные) или посредством поперечного мостика (грамположительные), пептидом, характерным для каждого вида [8].

Благодаря своей способности разрушать клеточную стенку бактерий, лизоцим считается эндогенным антибиотиком, незаменимым для защиты от микробов с момента его открытия А. Флемингом в 1921 году., когда несколько капель его носовых выделений, попавших в культуральную среду, блокировали рост бактерий, что наблюдалось через несколько дней. С тех пор было хорошо известно присутствие лизоцима во многих формах секреции человека (например, в слюне и слезах), а также в секреции тканей и органов (например, в плаценте, сперме, лейкоцитах, крови). Лизоцим представляет собой небольшой мономерный белок, стабилизированный четырьмя дисульфидными связями между восемью цистеиновыми остатками его цепи.

Лизоцимы присутствуют не только в органах, тканях и секрете человека, но также в органах и секретах различных позвоночных, беспозвоночных, бактерий и растений. Их подразделяют на три основных семейства: куриный тип (с-тип), гусиный тип (g-тип) и беспозвоночный тип (i-тип); также известны лизоцимы фагового типа, бактериального типа и растительного типа. Лизоцимы курицы (cLys) и человека (hLys) относятся к Lys с-типа. cLys состоит из 129 аминокислотных остатков (14,3 кДа), тогда как hLys состоит из 130 аминокислотных остатков (14,7 кДа). Существует 59% идентичность последовательностей лизоцимов человека и курицы, но антибактериальная активность hLys в три раза превышает антибактериальную активность cLys.

Антибактериальное действие лизоцима особенно эффективно в отношении грамположительных бактерий из-за его способности гидролизовать β -1,4-гликозидную связь, присутствующую в полисахаридном слое клеточных стенок этих бактерий. Эффект против грамотрицательных бактерий значительно слабее из-за наличия защитного слоя липополисахаридов на внешней мембране.

Предложено и успешно разработано множество методов физических и химических, направленных на повышение чувствительности грамотрицательных бактерий к лизоциму.

Лизоцим имеет большой потенциал, главным образом в медицине, ветеринарии, местах общего питания (кафе, столовые, рестораны). Главная особенность заключается в самой ферментативной активности вещества. Он обладает антибактериальной, противовирусной, противогрибковой, противовоспалительной, противораковой и иммуномодулирующую активностью. Наука имеет возможность использовать данный фермент для лечения и профилактики патогенных возбудителей различной микробиологической природы. В научной литературе описано множество примеров успешного применения белка на практике.

Продолжающийся рост устойчивости бактерий к антибиотикам побуждает к идентификации новых молекул или новым применениям известных соединений, например, в случае лизоцима. Существует вероятность появления устойчивости к ферментам, разрушающим пептидогликаны, в том числе к лизоциму. Грамположительные бактерии преимущественно достигают устойчивости за счет модификаций пептидогликана; напротив, многие грамотрицательные бактерии склонны использовать белки-ингибиторы, которые связывают активный центр ферментов, разрушающих пептидогликаны, блокируя их активность. Развитие резистентности к этим ферментам авторы определяют как редкое событие, по крайней мере *in vitro*, возникающее не за счет мутаций *de novo*, а за счет горизонтального переноса детерминант резистентности. Считается, что клиническое использование ферментов, разрушающих пептидогликаны, сопряжено с меньшим риском резистентности из-за их природы как рекомбинантных белков.



БИОПЛЁНКИ КАК БАКТЕРИАЛЬНЫЕ СООБЩЕСТВА

Сложные и высоко динамичные бактериальные сообщества можно обнаружить на поверхностях внутри полости рта, желудочно-кишечного тракта, а также полости влагалища, и все они образуют биопленки различной сложности, уникальные для каждого человека. Большинство микроорганизмов существуют в виде сидячих сообществ (биопленок), которые имеют свою собственную организацию и законность, в то время как лишь немногие находятся в свободной планктонной форме [6, 9].

Биопленки - это связанные с поверхностью микробные сообщества, которые происходят от своих планктонных аналогов путем образования внеклеточного полимерного вещества-матрицы, который действует как защитная оболочка от воздействия факторов окружающей среды. Напротив, биопленки представляют серьезную проблему для здоровья, которая проявляется в том факте, что они характеризуются размножением внутри них патогенных видов, и как таковые они вовлечены в часто повторяющиеся воспалительные заболевания. Существует определенный для штамма порог концентрации лизоцима, после которого потенциал образования биопленки снижается.

Определённые исследования подтверждают защитную функцию врожденной иммунной системы против биопленочных инфекций, поскольку они указывают на антибактериальную активность лактоферрина, который вместе с лизоцимом и пероксидазой является повсеместным и распространенным компонентом внешней секреции человека. Хорошо известный эффект лизоцима в том, что он расщепляет специфические связи в пептидогликанном слое, но другие возможные пути его антимикробной активности, такие как возможности его сигнальных молекул, изучены недостаточно.

СТАФИЛОКОКК И СТРЕПТОКОКК

Staphylococcus aureus является наиболее распространенной причиной первичных и послеоперационных инфекций кожи, и он становится все более устойчивым к антибиотикам, пр.: метициллин и ванкомицин. Использование лизоцима из яичных белков и его декстранового конъюгата было исследовано в качестве альтернативной мази местного применения для лечения инфицированной кожи мышей. Оба препарата были протестированы *in vitro* против *S. aureus* и *E. coli*. Результаты показали, что как лизоцим, так и конъюгат лизоцима проявляют антибактериальную активность против *S. aureus*, но только конъюгат лизоцима был активен против *E. coli*. Активность конъюгированного лизоцима авторы объяснили сильной поверхностной активностью, которая может усиливать литическое действие фермента в отношении слоя пептидогликана во внутренней мембране. Исследования на мышах также подтвердили улучшение антибактериальной активности лизоцима при заживлении ран за счет конъюгации с декстраном. Активность лизоцима, конъюгированного с декстраном, была сопоставима с активностью тетрациклина, что позволяет предположить, что лизоцим является природным противомикробным средством и подходящей заменой синтетическому антибиотику.

S. aureus, включая MSSA и MRSA-1, является важным патогеном человека, который образует биопленки в носоглотке, передних отделах носа и коже здоровых людей, но также может способствовать развитию заболевания практически в любой ткани человеческого организма. Успешная инвазия *S. aureus* в систему регулируется «чувством кворума» что имеет решающее значение для правильного формирования биопленки. [6]

Однако анализ изученной литературы показал, что биопленка *S. aureus* индуцирует экспрессию лизоцима на более высоком уровне, чем планктонные клетки, указывает на то, что биопленка *S. aureus* влияет на врожденную иммунную систему. Ассоциированные с биопленкой MSSA и MRSA MRSA имеют особое клиническое значение, поскольку они



демонстрируют врожденную устойчивость к противомикробным препаратам и клиренс защитными силами организма и, вероятно, способствуют персистенции и резистентности к лечению стафилококковых инфекций [10].

Согласно рассмотренными нами исследованиями, лизоцим в дозе 5 мг/мл не оказывал никакого влияния на подавление биопленки, образуемой *S. aureus*, и не ингибировал рост выбранных штаммов. Все штаммы MRSA образуют биопленки на слабом или умеренном уровне. Все ранее умеренно формировавшиеся штаммы MRSA теряли способность образовывать биопленки при 30 мг/мл лизоцима, тогда как в присутствии более низких концентраций фермента их способность к образованию биопленок либо сохранялась, либо усиливалась.

Изученные зарубежные работы продемонстрировали дифференциальный эффект лизоцима против различных видов бактерий, в результате чего было обнаружено, что лизоцим обладает средней ингибирующей концентрацией <500 мг/мл на рост кишечной палочки. В прошлом лизоцимом, по-видимому, пренебрегали, и в настоящее время подчеркиваются огромные потребности в противомикробных препаратах.

Streptococcus pneumoniae — грамположительная бактерия, вызывающая множество инфекций, от обычного и обычно легкого отита и риносинусита до инвазивных заболеваний, таких как сепсис, пневмония и менингит [7, 9].

Поскольку он становится все более устойчивым к антибиотикам, были разработаны новые противомикробные препараты, в том числе с использованием бактериофагов и некоторых их продуктов. Два пневмококковых фаговых лизоцима (Cpl-1 и Cpl-7) были выбраны с целью конструирования четырех димерных белков путем перетасовки их двух функциональных доменов и линкеров. Способность этих новых ферментов уменьшать образование пневмококковой биопленки и уничтожать пневмококковые бактерии изучалась на мышах. Один из них показал большую бактерицидную способность, чем природный Cpl-1. *S. mutans* вызывает образование биопленки в полости рта человека и кариес. Проведено исследование по повышению активности декстраназной жидкости для полоскания рта *Arthobacter oxydans* KQ11 за счет сочетания ZnSO₄, лизоцима, лимонной кислоты и хитозана. Оптимизированная формула, протестированная на жидкости для полоскания рта с морской декстраназой, усилила ингибирование *S. mutans*. [1, 4]

Антибактериальную фотодинамическую терапию применяют при кариесе, эндодонтических заболеваниях, пародонтите и периимплантите. В этом методе используются активные формы кислорода, такие и свободные радикалы, через фотосенсибилизаторы, чтобы уменьшить бактериальные инфекции. Чтобы преодолеть узкий спектр длин волн возбуждения для генерации O₂ обычно выбираемых фотосенсибилизаторов, был предложен новый нанокластерный фотосенсибилизатор Au. Этот новый фотосенсибилизатор представляет собой конъюгат лизоцима-нанокластера золота (AuNC) и бенгальской розы (RB). Было показано, что этот конъюгат эффективно ингибирует рост грамотрицательных и грамположительных бактерий полости рта при воздействии облучения белыми светодиодами. Фото возбужденный Lys-AuNCs-RB успешно уменьшал образование биопленки *S. Mutans*.

Образование биопленки вокруг имплантатов является основной причиной инфекций слизистой оболочки и кости, прилегающей к имплантату. Включение антибактериальных соединений в покрытие зубных имплантатов является эффективной стратегией предотвращения образования биопленок. Лизоцим иммобилизовали на поверхности титана, образуя исходный функциональный слой. Впоследствии эта основа была покрыта нано частицами серебра, хитозаном и гиалоурановой кислотой с помощью техники послойной само сборки. Полученную поверхность исследовали методами СЭМ и рентгеновской



фотоэлектронной спектроскопии. Ингибирование образования биопленок и антибактериальную активность оценивали в отношении *S. aureus*. Результаты показали, что модифицированные поверхности Ti эффективно предотвращают колонизацию бактерий в течение 14 дней до заживления слизистой оболочки

Стрептококки могут вызывать заболевания – ангина, скарлатина, пневмония и другие виды инфекций [3].

Лизоцим действует на клеточную стенку стрептококка следующим образом:

1. Разрушение клеточной стенки: Лизоцим разрушает клеточную стенку бактерий, включая стрептококки и стафилококки. Он разрушает связи между полимерами пептидогликана, что приводит к лизису бактериальных клеток.

2. Угнетение роста: фермент может угнетать рост стрептококков, блокируя активность определенных ферментов, необходимых для их размножения и выживания.

3. Активация иммунной системы: мурамидаза также может активировать иммунную систему, стимулируя выработку цитокинов и других медиаторов воспаления. Это помогает организму бороться с инфекцией и усиливает иммунный ответ на стрептококк.

В целом, белок лизоцим играет важную роль в защите организма от стрептококковой инфекции.

Он также оказывает влияние на *Staphylococcus aureus*, хотя его эффект может быть менее значительным по сравнению со стрептококками. Лизоцим может разрушать клеточную стенку стафилококка, но эта бактерия имеет более сложную структуру стенки, чем стрептококки, что делает ее менее чувствительной к действию лизоцима. В целом, данный фермент играет роль в защите организма от *Staphylococcus aureus*, но его эффективность может быть ограничена из-за механизмов сопротивления этой бактерии. Одним из них является изменение клеточной стенки, которая становится менее доступной для действия иммунного белка. Также стафилококки могут продуцировать ферменты, которые разрушают лизоцим и делают его неактивным. Некоторые штаммы имеют гены, кодирующие белки, которые связываются с лизоцимом и предотвращают его взаимодействие с клеточной стенкой. Это позволяет бактериям выживать и размножаться, несмотря на наличие антимикробных, иммунных ферментов.

Все эти механизмы сопротивления делают *Staphylococcus aureus* более устойчивыми к действию лизоцима и могут ограничивать его эффективность в борьбе с этими микроорганизмами. Поэтому, для успешного контроля и лечения данной инфекции, часто требуется комплексное применение антибактериальных препаратов и методов лечения.

Заключение.

За последние два десятилетия опубликовано значительно количество работ, посвященных антимикробной активности лизоцима, которые наглядно показывают всеобщий интерес к этому не простому веществу. В решении проблемы традиционных бактериальных инфекций, устойчивых к антибиотикам - лизоцим часто рассматривается как потенциальная помощь. В мировой науке активно проводят исследования модификаций фермента для обширного применения в медицине, растениеводстве, ветеринарии, консервировании пищевых продуктов и кормах.

Сейчас проводят биологические изменения лизоцима для того, чтобы он легче проникал через внешнюю мембрану грамотрицательных бактерий. В скором будущем учёные откроют новые нано технологии: тонкие пленки, покрытия содержащие лизоцим. Они смогут обеспечить решение многих проблем. Таких, например, как образования бактериальных биопленок на медицинских устройствах. Сейчас медицина столкнулась с всеобщей устойчивостью патогенных микроорганизмов к уже открытым, изученным



антимикробным средствам. Возможным выходом является использование комбинации антимикробных ферментов, белков и обычных антибиотиков как способ борьбы с антибиотикорезистентностью.

В заключение представляется уместным завершить этот обзор знаменитой цитатой Александра Флеминга: «Мы еще услышим о лизоциме!»

Список литературы:

1. Тимченко, В. Н. Эволюция стрептококковой инфекции : руководство / В.Н. Тимченко, В. В. Леванович. — Санкт-Петербург : СпецЛит, 2015. — 495 с. — ISBN 978-5-299-00649-0. — Текст : электронный // Лань : электронно-библиотечная система. — URL: <https://e.lanbook.com/book/60165>

2. Дьякова, Н. А. Гигиена и экология человека / Н. А. Дьякова, С. П. Гапонов, А.И. Сливкин. — Санкт-Петербург : Лань, 2023. — 300 с. — ISBN 978-5-507-45666-6. — Текст : электронный // Лань : электронно-библиотечная система. — URL: <https://e.lanbook.com/book/279788>

3. Петрова, Н. Г. Общий уход за пациентами : учебное пособие / Н. Г. Петрова, М.Н. Степанова, С. А. Калинина ; под редакцией Н. Г. Петровой. — 2-е изд., испр. и доп. — Санкт-Петербург : СпецЛит, 2021. — 223 с. — ISBN 978-5-299-01089-3. — Текст : электронный // Лань : электронно-библиотечная система. — URL: <https://e.lanbook.com/book/256148>

4. Сбойчаков, В. Б. Микробиология, основы эпидемиологии и методы микробиологических исследований : учебник / В. Б. Сбойчаков. — 3-е изд. — Санкт-Петербург : СпецЛит, 2017. — 712 с. — ISBN 978-5-299-00745-9. — Текст : электронный // Лань : электронно-библиотечная система. — URL: <https://e.lanbook.com/book/114901>

5. Биологические препараты для профилактики вирусных заболеваний животных: разработка и производство в Беларуси / П. А. Красочко, Н. А. Ковалев, И. В. Насонов, А. С. Ястребов. — Минск : Белорусская наука, 2016. — 492 с. — ISBN 978-985-08-2013-6. — Текст : электронный // Лань : электронно-библиотечная система. — URL: <https://e.lanbook.com/book/90585>

6. Медицинская микробиология, вирусология и иммунология : Т. 2 [Электронный ресурс]: учебник / под ред. Зверева В.В., Бойченко М.Н. - М. : ГЭОТАР-Медиа, 2021. Режим доступа: <http://client.studmedlib.ru/book/ISBN9785970458365.html>

7. Мудрецова-Висс, К. А. Основы микробиологии : учебник / К. А. Мудрецова-Висс, В. П. Дедюхина, Е. В. Масленникова. — 5-е изд., испр. и доп. — Москва : ФОРУМ : ИНФРА-М, 2020. — 384 с. — (Высшее образование: Бакалавриат). - ISBN 978-5-8199-0909-6. - Текст : электронный. - URL: <https://znanium.com/catalog/product/1065571>

8. Магер, С. Н. Физиология иммунной системы : учебное пособие / С. Н. Магер, Е. С. Дементьева. — Санкт-Петербург : Лань, 2022. — 192 с. — ISBN 978-5-8114-1705-6. — Текст : электронный // Лань : электронно-библиотечная система. — URL: <https://e.lanbook.com/book/211700>

9. Инфекционная безопасность : учебное пособие / И. В. Бубликова, З. В. Гапонова, Н.А. Смирнова, О. Г. Сорока. — 3-е изд., стер. — Санкт-Петербург : Лань, 2021. — 240 с. — ISBN 978-5-8114-7184-3. — Текст : электронный // Лань : электронно-библиотечная система. — URL: <https://e.lanbook.com/book/156362>

10. Di, R., D. Dong, L. Ye, and Y. Zhao. 2016. Staphylococcus aureus biofilm influences the expression of lysozyme, SLPI and gp340 in a human sinonasal explant model. J. Clin. Otorhinolaryngol Head Neck Surg. 30:194–199.

11. Gowrishankar, S., A. Kamaladevi, K. Balamurugan, and S.K. Pandian. 2016. In vitro and in vivo biofilm characterization of methicillin-resistant Staphylococcus aureus from patients associated with pharyngitis infection. Biomed Res. Int. 2016:1289157.

