

ИЗУЧЕНИЕ КАТАЛАЗНОЙ АКТИВНОСТИ МИКРОСИМБИОНТОВ ЖЕНСКОГО РЕПРОДУКТИВНОГО ТРАКТА ХРОНОБИОЛОГИЧЕСКИМ МЕТОДОМ



М.В. Николенко, Е.М. Васева, Н.В. Барышникова, О.И. Малишевская

ФГБОУ ВО Тюменский государственный медицинский университет Минздрава России, г. Тюмень, Россия

Резюме. Каталаза — гемсодержащий фермент, относящийся к факторам защиты, разрушающий перекисные соединения. Наличие каталазной активности является важной способностью микроорганизмов, позволяющей им защищаться от неблагоприятных факторов, а также адаптироваться в условиях макроорганизма. Каталаза наряду с супероксиддисмутазой играют важную роль в устойчивости патогенов к кислородзависимым бактерицидным механизмам фагоцитов. Целью исследования являлось изучение каталазной активности микросимбионтов женского репродуктивного тракта при нормоценозе и кандидозном дисбиозе хронобиологическим методом. Исследование проводили на клинических изолятах, выделенных из микросимбиоценозов женского репродуктивного тракта. Активность каталазы определяли спектрофотометрическим методом по убыли пероксида водорода в течение суток с 3-часовым интервалом в зимнее время года. Динамику изменения каталазной активности оценивали с 3–5-кратным повторением условий эксперимента. У отдельных видов молочнокислых бактерий обнаружена каталаза, не содержащая гемовой группы — псевдокаталаза. Хронобиологический метод позволил выявить активность фермента у всех микросимбионтов. Доминантная и ассоциативная микробиота, выделенная от здоровых женщин, характеризовалась циркадианными (околосуточными) ритмами каталазной активности в ранние утренние часы — 5:00 ($p < 0,05$). Перекись водорода разлагается спонтанно или с участием неферментативных катализаторов, и микроорганизмы справляются с ней в этих условиях. У микросимбионтов, характерных для дисбиоза женского репродуктивного тракта и обычно обнаруживаемых в большом количестве на фоне снижения *Lactobacillus* spp., регистрировались ультрадианные ритмы с 12- и 8- часовыми гармониками каталазной активности с акрофазой в утренние и вечерние часы (8:00; 20:00). Минимальные значения продукции фермента у всех культур фиксировались в 12:00 и 17:00 часов. Таким образом, вклад ритма изучаемого показателя при различной степени чистоты влагиалища отражает адаптационные возможности патогенов к условиям существования и может лежать в основе при изучении механизмов их регуляции. Мезор и амплитудно-фазовая стабильность являются универсальными ритмометрическими параметрами, оценивающими состояние пациента и не зависящими от видовой принадлежности культуры.

Ключевые слова: каталазная активность, хронобиологический метод, ритмометрические параметры, нормоценоз, дисбиоз, *Lactobacillus* spp.

Адрес для переписки:

Николенко Марина Викторовна
625023, Россия, г. Тюмень, ул. Одесская, 54,
Тюменский государственный медицинский университет.
Тел.: 8 3452 20-04-77, 8 905 823-37-90 (моб.).
E-mail: nikolenko-marina@mail.ru

Contacts:

Marina V. Nikolenko
625023, Russian Federation, Tyumen, Odesskaya str., 54,
Tyumen State Medical University.
Phone: +7 3452 20-04-77, +7 905 823-37-90 (mobile).
E-mail: nikolenko-marina@mail.ru

Для цитирования:

Николенко М.В., Васева Е.М., Барышникова Н.В., Малишевская О.И.
Изучение каталазной активности микросимбионтов женского
репродуктивного тракта хронобиологическим методом // Инфекция
и иммунитет. 2023. Т. 13, № 6. С. 1187–1191. doi: 10.15789/2220-7619-
CAT-15453

Citation:

Nikolenko M.V., Vaseva E.M., Baryshnikova N.V., Malishevskaya O.I.
Chronobiological approach to study microsymbiont catalase activity
in female reproductive tract // Russian Journal of Infection and
Immunity = Infektsiya i immunitet, 2023, vol. 13, no. 6, pp. 1187–1191.
doi: 10.15789/2220-7619-CAT-15453

Исследование проведено в рамках гранта Тюменского ГМУ в области биомедицинских и биофармацевтических технологий № 8210053 от 12 августа 2021 г.
The study was supported by the grant of Tyumen State Medical University in biomedical and biopharmaceutical technologies No. 8210053 (August 12, 2021).

CHRONOBIOLOGICAL APPROACH TO STUDY MICROSymbiont CATALASE ACTIVITY IN FEMALE REPRODUCTIVE TRACT

Nikolenko M.V., Vaseva E.M., Baryshnikova N.V., Malishevskaya O.I.

Tyumen State Medical University, Tyumen, Russian Federation

Abstract. Catalase is a heme-containing enzyme belonging to protection factors that destroys peroxide compounds. The presence of catalase activity is an important ability of microorganisms that allows them to be protected from unfavorable factors as well as adapt to macroorganism conditions. Catalase along with superoxide dismutase plays an important role in pathogen resistance to phagocyte oxygen-dependent bactericidal mechanisms. The aim of the study was to investigate microsymbiont catalase activity from female reproductive tract in normocenosis and candidiasis dysbiosis using the chronobiological approach. The study was conducted on clinical isolates, isolated from female reproductive tract microsymbiocenosis. The catalase activity was determined by spectrophotometry based on 24 hour-long hydrogen peroxide reduction with 3-hours interval in winter season. Dynamic hydrogen peroxide was assessed in 3–5 experiment replicates. In some *Lactobacillus* spp., catalase was found containing no heme group — pseudocatalase. Chronobiological approach allowed to reveal enzyme activity from all microsymbionts. The dominant and associative microbiota isolated from healthy females was characterized by circadian (24 hours) rhythms of catalase activity early in the morning — 5 a.m. ($p < 0.05$). Hydrogen peroxide decomposes spontaneously or via non-enzymatic catalysts, and microorganisms cope with this situation under such conditions. In microsymbionts characteristic of female reproductive tract dysbiosis, and usually found in large numbers along with decreased *Lactobacillus* spp. ultradian rhythms with 12- and 8-hour harmonics of catalase activity with acrophase were recorded in the morning (8 a.m.) and evening hours (8 p.m.). The minimum values of enzyme production in all cultures were recorded at 12 p.m. and 5 p.m. Therefore, the contribution of the rhythm of the studied parameter at varying degree of vaginal sterility reflects the adaptive pathogen capabilities to the conditions of existence and can be the basis for studying related regulatory mechanisms. Mesor and amplitude phase stability are universal rhythmometric parameters used to evaluate patient's condition independent of species assignment.

Key words: catalase activity, chronobiological approach, rhythmic parameters, normocenosis, dysbiosis, *Lactobacillus* spp.

Введение

Микробный биоценоз как совокупность бактериально-грибковых ассоциаций функционирует за счет различных биологических механизмов, обеспечивающих рост, размножение микросимбионтов, распределение их в экотопе и различные взаимодействия внутри популяции. Регулирование и формирование микробиоценоза в системе ассоциативного симбиоза основано на явлении антагонизма с одной стороны, продукция бактериями бактериоцинов, с другой — синтез лизоцима, органических кислот и перекиси водорода макроорганизмом [1].

В связи с этим возникает вопрос о влиянии биологически активных веществ доминантной, ассоциативной микробиоты на отдельные ферменты, обеспечивающие защиту микросимбионтов от стрессовых воздействий со стороны, как микробной ассоциации, так и макроорганизма. Одним из таких ферментов является каталаза, защищающая бактериальную клетку от действия перекиси водорода эндогенного и экзогенного происхождения [11].

Решение вопроса о способности микроорганизмов влиять на активность каталазы позволило бы расширить представления о роли различных видов автохтонных и аллохтонных микросимбионтов в формировании микробных биоценозов организма человека. На наш взгляд, хронобиологический подход к изучению данной проблемы открывает новые возможности в раскрытии механизмов межмикробных взаи-

модействий, а также позволяет разработать дополнительные критерии состояния здоровья пациента.

Цель — изучить каталазную активность микросимбионтов женского репродуктивного тракта при нормоценозе и кандидозном дисбиозе хронобиологическим методом.

Материалы и методы

Для выявления межмикробных взаимодействий микроорганизмов было изучено 10 микросимбиоценозов женского репродуктивного тракта (5 — нормоценозов и 5 — кандидозных дисбиозов), изолировано 45 культур микроорганизмов, представителей облигатно- и факультативно анаэробной микробиоты пациентов в возрасте от 19 до 35 лет (Решение Комитета по этике при ФГБОУ ВО Тюменского государственного медицинского университета № 102 от 22.10.2021 г.). Женщины имели регулярный менструальный цикл, в анамнезе отсутствовали гинекологические оперативные вмешательства, аборт, выкидыши, гормональная терапия, инфекционные заболевания, передаваемые половым путем (ВИЧ-инфекция, сифилис, гонорея, трихомониаз, хламидиоз). Видовая идентификация микросимбионтов проводилась методом времяпролетной масс-спектрометрии с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией (MALDI-ToF MS) по протеиновым профилям.

Микробная ассоциация при нормобиозе биотопа включала *Lactobacillus crispatus* (*L. crispatus*

tus), *Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*) и *Enterococcus faecium* (*E. faecium*). При дисбиозе преобладали *Lactobacillus iners* (*L. iners*), *Lactobacillus jensenii* (*L. jensenii*), *Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*) и *Enterococcus faecium* (*E. faecium*), *Klebsiella pneumoniae* (*K. pneumoniae*), *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), *Escherichia coli* (*E. coli*), *Candida albicans* (*C. albicans*).

Активность каталазы определяли спектрофотометрическим методом по убыли пероксида водорода в течение суток с 3-часовым интервалом [3] в зимнее время года, IV фаза Луны. К 0,2 мл взвеси микроорганизмов добавляли 1 мл раствора перекиси водорода с концентрацией 0,0120 М, инкубировали 10 мин при комнатной температуре, затем прибавляли 0,2 мл раствора хлористоводородной кислоты с концентрацией 2 М и 1 мл раствора калия йодида с концентрацией 0,025 М, перемешивали, центрифугировали в режиме 3000 об/мин и 15 мин, после чего измеряли оптическую плотность надосадочной жидкости не позднее 10 мин после центрифугирования при длине волны 492 нм. Контрольный опыт готовили по аналогичной процедуре, без добавления взвеси микроорганизмов. Раствор сравнения при спектрофотометрии — вода очищенная.

Данные были обработаны по методу наименьших квадратов (косинор-анализ) при заданной значимости достоверности $p < 0,05$ [9]. Для каждого штамма впоследствии определены основные параметры ритмов с периодами $T = 12$ и $T = 24$ часа: мезор (М) — среднее значение гармонической кривой наилучшей аппроксимации функции (косинусоиды), амплитуда ритма (А) — расстояние от экстремума до мезора и акрофаза (f) — момент времени ожидаемого экстремума функции.

Статистическую обработку материалов осуществляли с использованием программ: Primer of Biostatistics Version 4.03 by Stanton A. Glantz, 1998; Microsoft Office Excel 2010.

Результаты и обсуждение

Микробиота женского репродуктивного тракта — уникальная модель для изучения межмикробных взаимоотношений при ассоциативном симбиозе, так как это равновесная динамическая система организма человека и населяющей его доминантной и ассоциативной микрофлоры. Важнейшими представителями облигатной доминантной микробиоты влагалища являются *Lactobacillus* spp., поддерживающие нормальный микробиологический статус занимаемого биотопа.

По данным авторитетных исследований, у многих строгих и аэротолерантных анаэробов отсутствует продукция каталазы [2]. К их числу относят молочнокислые бактерии, у которых дисмутацию образующихся ионов кислорода обеспечивают ионы магния, находящиеся в клетках в высоких концентрациях [4].

В пилотных экспериментах традиционный тест на расщепление 3% перекиси водорода культурами *L. crispatus*, *L. iners*, *L. jensenii*, *E. faecalis*, *E. faecium* показал отрицательный результат. Отсутствие каталазы у молочнокислых бактерий и энтерококков связано с тем, что они не могут синтезировать гем-простетическую группу фермента, но способны к синтезу апофермента [6]. У отдельных видов молочнокислых бактерий обнаружена каталаза, не содержащая гемовой группы — псевдокаталаза [8].

Высокочувствительный хронобиологический метод позволил выявить активность такого фермента у всех изучаемых культур микросимбионтов. Доминантная и ассоциативная микробиота, выделенная от здоровых женщин, характеризовалась циркадианными (околосуточными) ритмами каталазной активности с одним пиком в ранние утренние часы — 5:00. Вклад циркадианного ритма составил 79,3–84,5% ($p < 0,05$). Для всех культур *Lactobacillus* spp. и *Enterococcus* spp. характерен одинаковый профиль ритма. Мезор и амплитуда каталазной активности как стабильные ритмометрические параметры не зависели от вида микроорганизма в популяции. Чем больше амплитуда, тем труднее индуцировать сдвиг акрофазы [10]. Результаты представлены на рис. 1.

Следовательно, при доминировании в биотопе анаэробных прокариот *L. crispatus* 10^6 – 10^7 КОЕ/мл, *E. faecalis* и *E. faecium* 10^2 – 10^3 КОЕ/мл, способных переносить контакт с кислородом и его производными в относительно небольших масштабах, роль каталазы незначительная, с одним пиком активности в утренние часы. Перекись водорода разлагается спонтанно или с участием неферментативных катализаторов, и микроорганизмы справляются с ней в этих условиях. Таким образом, при осуществлении энергетического метаболизма анаэробного типа для устранения токсических эффектов кислорода достаточно одной ферментной преграды в виде супероксиддисмутазы [5].

У микросимбионтов, характерных для дисбиоза женского репродуктивного тракта и обычно обнаруживаемых в большом количестве на фоне снижения *Lactobacillus* spp. регистрировались ультрадианные ритмы с 12- и 8-часовыми гармониками каталазной активности с акрофазой в утренние и вечерние часы (8:00; 20:00). Минимальные значения продукции фермента у всех культур фиксировались в 12:00 и 17:00 часов (рис. 2).

Экспериментально доказано повышение среднесуточных показателей синтеза фермента в 6–8 раз у всех ассоциантов в микросимбиозе ($p < 0,05$) в опытной группе при дисбиотических изменениях изучаемого биотопа, по сравнению с контрольной группой. Таким

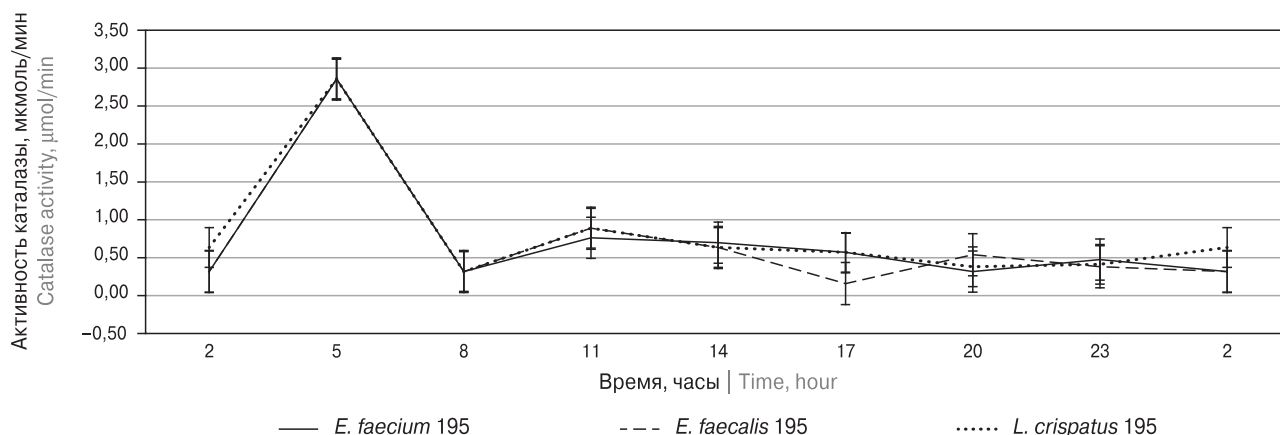


Рисунок 1. Суточная динамика активности каталазы микросимбионтов женского репродуктивного тракта у здоровых женщин

Figure 1. Diurnal dynamics of microsymbiont catalase activity in healthy female reproductive tract

Примечание. По оси абсцисс — время суток, часы; по оси ординат — активность каталазы, мкмоль/мин.
 Note. X-axis — time of day, hours; Y-axis — catalase activity, μmol/min.

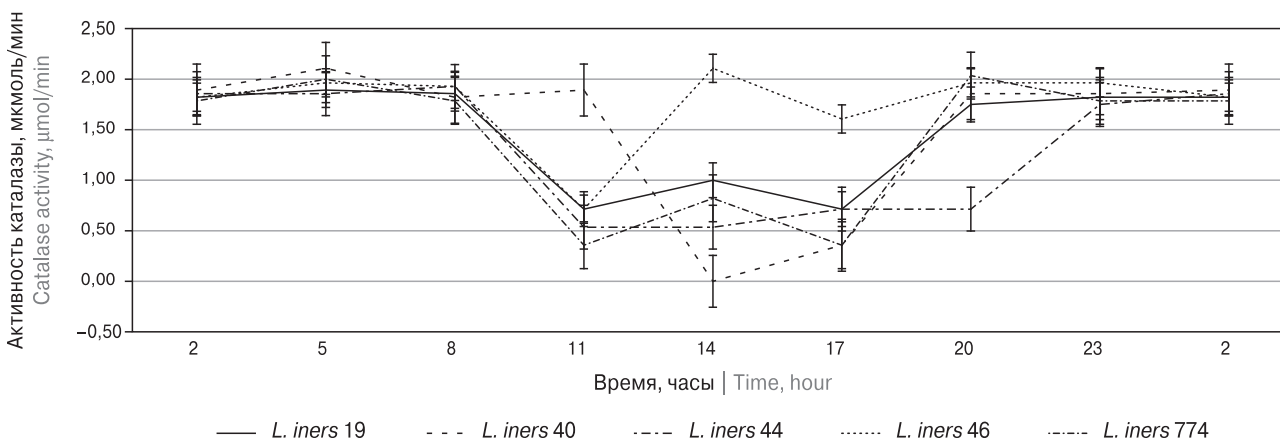


Рисунок 2. Суточная динамика активности каталазы микросимбионтов женского репродуктивного тракта у женщин с кандидозным дисбиозом

Figure 2. Diurnal dynamics of microsymbiont catalase activity in female reproductive tract during candidiasis dysbiosis

Примечание. По оси абсцисс — время суток, часы; по оси ординат — активность каталазы, мкмоль/мин.
 Note. X-axis — time of day, hours; Y-axis — catalase activity, μmol/min.

образом, мезор и амплитудно-фазовая стабильность являются диагностическими критериями состояния биотопа пациента.

При увеличении в популяции факультативно-анаэробных прокариот *E. faecalis*, *E. faecium*, *K. pneumonia*, *S. aureus*, *E. coli*, *C. albicans* в 10^5 – 10^6 КОЕ/мл и снижение числа *L. iners*, *L. jensenii* до 10^3 – 10^4 КОЕ/мл неферментативные пути устранения перекиси водорода становятся не эффективными. Для разложения субстрата, необходима каталаза, проявляющая активность с периодичностью в 8–12 часов. Таким образом, в условиях активного взаимодействия клеток с кислородом, делающего возможным аэробную жизнь, система ферментной защиты от его токсических эффектов сформирована с участи-

ем супероксиддисмутазы, каталазы и пероксидазы в качестве необходимых компонентов.

Вероятно, в биотопе женщин с 3–4 степенью чистоты влагалища анаэробные бактериальные клетки координируют экспрессию фактора патогенности, обеспечивающую многообразные формы существования с помощью системы QS [7] за счет облигатно- и факультативно-аэробных прокариот [6].

Выводы

Хронобиологический метод позволил выявить активность фермента у всех микросимбионтов, выделенных из женского репродуктивного тракта.

Доказано, что вклад ритма изучаемого показателя при различной степени чистоты влаги отражает адаптационные возможности патогенов к условиям существования и может служить методическим ключом при изучении механизмов их регуляции.

Мезор и амплитудно-фазовая стабильность каталазной активности микросимбионтов являются универсальными ритмометрическими параметрами, оценивающими состояние па-

циента, и не зависят от видовой принадлежности культуры.

Благодарности

Коллектив авторов выражает благодарность Тюменскому ГМУ за предоставленное финансирование и директору ФБУН ТНИИКИП Роспотребнадзора Т.Ф. Степановой за проведенную идентификацию культуры.

Список литературы/References

1. Андруков Б.Г., Сомова Л.М., Тимченко Н.Ф. Стратегии программированной клеточной гибели у прокариот // Инфекция и иммунитет. 2015. Т. 5, № 1. С. 15–26. [Andrukov B.G., Somova L.M., Timchenko N.F. Strategy of programmed cell death in prokaryotes. *Infeksiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2015, vol. 5, no. 1, pp. 15–26. (In Russ.)] doi: 10.15789/2220-7619-2015-1-15-26
2. Брюханов А.Л., Нетрусов А.И. Аэротолерантность строго анаэробных микроорганизмов: факторы защиты от окислительного стресса (обзор) // Прикладная биохимия и микробиология. 2007. Т. 43, № 6. С. 635–652. [Bryukhanov A.L., Netrusov A.I. Aerotolerance of strictly anaerobic microorganisms: factors of protection from oxidative stress (review). *Prikladnaya biokhimiya i mikrobiologiya = Applied Biochemistry and Microbiology*, 2007, vol. 43, no. 6, pp. 635–652. (In Russ.)]
3. Бухарин О.В., Черкасов С.В., Сгибнев А.В., Забирова Т.М., Иванов Ю.Б. Влияние микробных метаболитов на активность каталазы и рост *Staphylococcus aureus* 6538 P // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2000. Т. 130, № 7. С. 80–82. [Bukharin O.V., Cherkasov S.V., Sgibnev A.V., Zabirowa T.M., Ivanov Yu.B. Influence of microbial metabolites on catalase activity and growth of *Staphylococcus aureus* 6538 P. *Byulleten' eksperimental'noi biologii i meditsiny = Bulletin of Experimental Biology*, 2000, vol. 130, no. 7, pp. 80–82. (In Russ.)]
4. Курбанов А.И., Караев З.О. Роль каталазы и супероксиддисмутазы микроорганизмов при их фагоцитозе макрофагальными клетками // Биомедицина. 2005. № 3. С. 44–45. [Kurbanov A.I., Karaev Z.O. The role of catalase and superoxide dismutase of microorganisms during their phagocytosis by macrophage cells. *Biomeditsina = Biomedicine*, 2005, no. 3, pp. 44–45. (In Russ.)]
5. Романова Е.В. Ферменты в антиокислительной системе растений: супероксиддисмутазы // АГРО XXI. 2008. № 7–9. С. 28–29. [Romanova E.V. Enzymes in the antioxidant system of plants: superoxide dismutase. *AGRO XXI*, 2008, no. 7–9, pp. 28–29. (In Russ.)] URL: <https://www.agroxxi.ru/journal/20080709/20080709013.pdf>
6. Сахно О.Н., Трифонова Т.А. Экология микроорганизмов: учебное пособие: В 3 частях. Часть 2. Владимир: Издательство Владимирского государственного университета, 2009. 52 с. [Sakhno O.N., Trifonova T.A. Ecology of microorganisms: textbook. Part 2. *Vladimir: Publishing House of the Vladimir State University*, 2009. 52 p. (In Russ.)] URL: <https://dspace.www1.vlsu.ru/bitstream/123456789/1383/3/00950.pdf>
7. Шпаков А.О. Сигнальные молекулы бактерий непептидной природы QS-типа // Микробиология. 2009. Т. 78, № 2. С. 163–175. [Shpakov A.O. Signal molecules of bacteria of non-peptide nature of QS-type *Mikrobiologiya = Mikrobiologiya (Microbiology)*, 2009, vol. 78, no. 2, pp. 163–175. (In Russ.)]
8. Bailly C., El-Maarouf-Bouteau H., Corbinau F. From intracellular signaling networks to cell death: the dual role of reactive oxygen species in seed physiology. *C. R. Biol.*, 2008, vol. 331, no. 10, pp. 806–814. doi: 10.1016/j.crv.2008.07.022
9. Nelson W., Tong Y.L., Lee J.K., Halberg F. Methods for cosinor-rhythmometry. *Chronobiologia*, 1979, vol. 6, no. 4, pp. 305–323.
10. Patent No. 5163426 United States, Int. Cl. A61M21/00; A61B10/00; A61M21/02; A61N5/06; (IPC1-7): A61N5/06. Assessment and modification of a subjects endogenous circadian cycle. No. 07/066677; application: 06.26.1987; date of publication 11.17.1992 / Czeisler C.A., Kronauer R.E., Allan J.S. Proprietors: Brigham, And Women's Hospital (Boston, MA). 75 p.
11. Zemser R.B., Martin S.E. Heat stability of virulence-associated enzymes from *Listeria monocytogenes* SLCC 5764. *J. Food Prot.*, 1998, vol. 61, no. 7, pp. 899–902. doi: 10.4315/0362-028x-61.7.899

Авторы:

Николенко М.В., д.б.н., профессор кафедры микробиологии, зав. лабораторией микробиома, регенеративной медицины и клеточных технологий ФГБОУ ВО Тюменский государственный медицинский университет Минздрава России, г. Тюмень, Россия;

Васева Е.М., к.фарм.н., доцент кафедры фармацевтических дисциплин ФГБОУ ВО Тюменский государственный медицинский университет Минздрава России, г. Тюмень, Россия;

Барышников Н.В., старший преподаватель кафедры микробиологии ФГБОУ ВО Тюменский государственный медицинский университет Минздрава России, г. Тюмень, Россия;

Малишевская О.И., к.фарм.н., доцент кафедры фармацевтических дисциплин ФГБОУ ВО Тюменский государственный медицинский университет Минздрава России, г. Тюмень, Россия.

Authors:

Nikolenko M.V., DSc (Biology), Professor of the Department of Microbiology, Head of Laboratory of Microbiome, Regenerative Medicine and Cellular Technologies, Tyumen State Medical University, Tyumen, Russian Federation;

Vaseva E.M., PhD (Pharmacy), Associate Professor, Department of Pharmaceutical Disciplines, Tyumen State Medical University, Tyumen, Russian Federation;

Baryshnikova N.V., Senior Lecturer, Department of Microbiology, Tyumen State Medical University, Tyumen, Russian Federation;

Malishevskaya O.I., PhD (Pharmacy), Associate Professor, Department of Pharmaceutical Disciplines, Tyumen State Medical University, Tyumen, Russian Federation.