



DOI: 10.31146/1682-8658-ecg-160-12-64-69

Оценка антиоксидантной активности *Clostridium (Clostridioides) difficile*

Сухина М. А., Образцов И. В.

ФГБУ «ГНЦК им. А. Н. Рыжих» Минздрава России, 123423, Москва, Россия, ул. Салыма Адила, 2

Evaluation of antioxidant activity of *Clostridium (Clostridioides) difficile*

I. V. Obraztsov, M. A. Sukhina

State Scientific Center of Coloproctology, 123423 Moscow, Russia, st. Salam Adil 2

Для цитирования: Сухина М. А., Образцов И. В. Оценка антиоксидантной активности *Clostridium (Clostridioides) difficile*. Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. 2018;160(12): 64–69. DOI: 10.31146/1682-8658-ecg-160-12-64-69

For citation: Obraztsov I. V., Sukhina M. A. Evaluation of antioxidant activity of *Clostridium (Clostridioides) difficile*. *Experimental and Clinical Gastroenterology*. 2018;160(12): 64–69. (In Russ.) DOI: 10.31146/1682-8658-ecg-160-12-64-69

✉ **Corresponding author:**

Сухина Марина Алексеевна

Marina A. Sukhina

marinamari272015@gmail.com

Образцов Игорь Владимирович, научный сотрудник отдела микробиологических и иммунологических исследований

Сухина Марина Алексеевна, кандидат биологических наук, руководитель отдела микробиологических и иммунологических исследований

Igor V. Obraztsov, Researcher, Department of Microbiological and Immunological Research, Scopus Author ID 57194769750, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6649-853X>

Marina A. Sukhina, PhD, head of department of microbiological and immunological researches, Scopus Author ID 57192270856, 36622384800, ORCID <https://orcid.org/0000-0003-4795-0751>

Резюме

Цель: разработка и апробация метода оценки антиоксидантной активности (АОА) *Clostridium (Clostridioides) difficile* на основе хемилюминесцентного анализа.

Материалы и методы: исследовали 10 штаммов *C. difficile*, полученных от пациентов с антибиотик-ассоциированной диареей при культивировании в течение двух суток. АОА оценивали на первые и вторые сутки инкубации методом хемилюминесцентного анализа в системе 2,2'-азо-бис(2-амидинопропан) дигидрохлорид–люминол.

Результаты: предлагаемый метод оценки АОА характеризуется высокой воспроизводимостью и надёжностью (средний коэффициент вариации между параллельными пробами находится в диапазоне 2,0–18,2%, коэффициент детерминации градуировочного графика — 80,5–89,4%). АОА *C. difficile* после первых суток культивирования составляет 6,95–9,93 ед. и достоверно возрастает до 9,86–13,27 ед. ($p < 0,01$) после вторых. Показана отрицательная корреляция ($\eta = -0,3$, $p < 0,05$) между исходным уровнем АОА и степенью её прироста в процессе культивирования.

Заключение: предложен простой и надёжный способ оценки АОА *C. difficile*, пригодный для рутинного применения в клинической бактериологии. Длительность культивирования *C. difficile* способствует увеличению её АОА.

Ключевые слова: *Clostridium (Clostridioides) difficile*, антиоксидантная активность, активные формы кислорода, хемилюминесценция

Summary

Aim: to develop and to evaluate a method for *Clostridium (Clostridioides) difficile* antioxidant activity (AOA) assessment via chemiluminescent (CL) analysis.

Materials and methods: we investigated ten *C. difficile* strains, obtained from patients with antibiotic-associated diarrhea that were cultured for two days. AOA was assessed on the first and second day of cultivation by means of CL assay based on 2,2'-azo-bis (2-amidinopropane) dihydrochloride-luminol system.

Results: our method for AOA estimation is characterized by high reproducibility and reliability (the average coefficient of variation between parallel samples is 2.0–18.2%, the calibration curve coefficient of determination is 80.5–89.4%). *C. difficile* AOA after the first day of cultivation is 6.95–9.93 units; it increases to 9.86–13.27 units after the second day ($p < 0.01$). A negative correlation ($\eta = -0.3$, $p < 0.05$) is shown between the initial AOA level and its growth rate during cultivation.

Conclusion: we propose a simple and reliable method for *C. difficile* AOA assessment that is suitable for routine use in clinical bacteriology. Length of *C. difficile* culturing is associated with increase of its AOA.

Key words: *Clostridium (Clostridioides) difficile*, antioxidant activity, reactive oxygen species, chemiluminescence

Введение

Кислород воздуха сам по себе достаточно инертен; однако в процессе одноэлектронного восстановления (при участии флаво- и хинопротеинов, НАДФ-Н оксидазы фагоцитов) образуются АФК, обладающие необычайной реактивностью. Первичные АФК формируются непосредственно из молекулярного кислорода; вторичные – в процессе дальнейшей метаболизации первичных АФК [5]. Классификация АФК представлена в таблице 1.

Многие микроорганизмы в процессе эволюции выработали механизмы защиты от АФК, представляющие собой специализированные системы ферментативных антиоксидантов: супероксид-дисмутаза, каталаза и пероксидазы, уровень которых находится под генетическим контролем. Наиболее изучен механизм осуществления генетического контроля у аэробных и факультативно-анаэробных бактерий. Долгое время традиционно считалось, что облигатно анаэробные бактерии не способны к росту в присутствии кислорода и уже при парциальном давлении кислорода атмосферы $\geq 0,2$ проявляют чувствительность к O_2 [1, 2]. Но, облигатно анаэробные микроорганизмы тоже выработали механизмы защиты от токсического действия кислорода, что необходимо для их повсеместного распространения. Род *Clostridium*, будучи облигатно анаэробным микроорганизмом, обладает системами защиты от токсического действия молекулярного кислорода и его метаболитов, обеспечивая аэротолерантность бактерии [3, 4]. В результате работы этих систем вместо ожидаемого бактерицидного эффекта кислорода часто наблюдается обратимое бактериостатическое действие.

Наличие механизмов антиокислительной защиты представляет собой важный фактор патогенности клостридий по двум причинам. Во-первых, он способствует выживанию микроорганизма на воздухе и его распространению с формированием циркулирующих внутрибольничных штаммов; во-вторых – позволяет клостридиям сопротивляться кислород-зависимой микробицидности фагоцитов, являющихся основными иммунологическими эффекторами, осуществляющими клиренс патогена [5, 6].

Деструктивные эффекты кислородных метаболитов можно разделить на прямые и опосредованные. К прямым деструктивным эффектам относится перекисное окисление липидов и белков, инактивация ферментов за счёт окисления SH-групп и окисление ДНК. Опосредованное действие АФК проявляется через повышение чувствительности к гидролазам, подавление ингибиторов нейтральных протеиназ, образование липидных хемоаттрактантов и вторичных биотоксинов, а также активацию коллагенолитических ферментов (металлопротеиназ).

Инактивация АФК у строгих анаэробов происходит за счёт ферментативных систем, включающих каталазы, пероксидазы и супероксид-дисмутазы (СОД). Для *C. difficile* характерно наличие СОД, каталазы и пероксиредоксина [8] поэтому её антиоксидантная активность (АОА) может в значительной мере обуславливать аэротолерантность возбудителя и определять его распространение и патогенность. На сегодняшний день разработано множество методов оценки АОА

Первичные	Вторичные
Супероксидный анион-радикал	Гипохлорит-анион
Перекись водорода	Пероксинитрит
Гидропероксид-радикал	Липоалкил
Гидропероксид-анион	Липоксил
Гидроксильный радикал	Липопероксил
Синглетный кислород	Липогидропероксил

Таблица 1.
Классификация АФК (по [7] с изменениями)

различных соединений и систем: волюмометрические, электрохимические, фото- и спектрофотометрические, а также основанные на хемилюминесцентном (ХЛ) анализе [9, 10]. К преимуществам ХЛ оценки АОА следует отнести простоту исполнения и стандартизации, а также значительную

экономическую эффективность, которые делают этот подход привлекательным для клинической микробиологии [11, 12, 13]. Поэтому целью настоящего исследования стала разработка и апробация подхода, позволяющего с помощью ХЛ анализа количественным образом оценить АОА *C. difficile*.

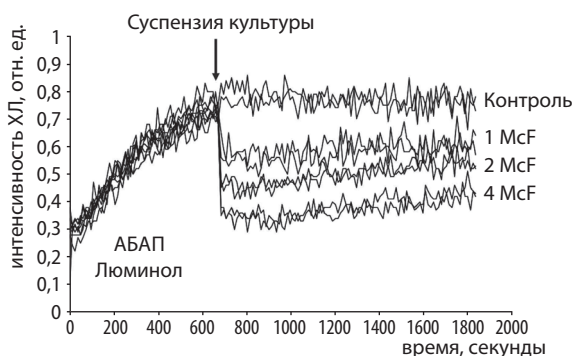
Материалы и методы

В работе использованы культуры 10 штаммов *C. difficile*, выделенных из просветных фекалий пациентов с антибиотик-ассоциированной диареей. Все образцы просветных фекалий исследовались одновременно иммунологическими, бактериологическим и молекулярно-биологическими методами. Определение токсинов А и В выполнено с помощью иммунохроматографического и иммуноферментного анализа (VEDA.LAB, Франция и Serazum®, Германия). Все этапы бактериологического исследования проводили в условиях анаэробной рабочей станции Vacutron (Sheldon Manufacturing Inc., США). Материал просветных фекалий засеивался на кровяной агар (Columbia agar с 7% эритроцитов баранов); агар для селективного выделения *Clostridium difficile* ("Coran", Италия) и культивировался в анаэробных условиях при 37 °С в течение 48 часов. Методом серийных разведений определяли минимальную подавляющую концентрацию антибиотиков: ванкомицин, метронидазол, цефтаролин, цефепим, фидаксомицин и клиндамицин. Определяли изменение АОА микроорганизмов в зависимости от возраста культуры, выполняя исследование на первые и вторые сутки после посева. Культуру *C. difficile* смывали с чашки раствором Isoton и доводили концентрацию до 4 McF, что соответствует $3,3 \times 10^{-8}$ КОЕ/мл. Исследование АОА проводили по методике М. М. Созаруковой и соавт. [14] с изменениями. Принцип метода заключается в использовании стандартизованного источника радикалов 2,2'-азо-бис (2-амидинопропан) дигидрохлорида (АБАП), который подвергается спонтанному терморазложению на пероксильный и алкоксильный радикалы. Радикалы АБАП детектируются ХЛ-зондом люминолом, вызывая дозозависимый ХЛ ответ в виде стационарного свечения. Внесение антиоксиданта в систему приводит к подавлению окислительных процессов и падению интенсивности ХЛ, при этом оценка

степени снижения ХЛ ответа позволяет дать количественную характеристику АОА аналита. Регистрацию ХЛ выполняли на хемилюминометре Lum-1200 (ДиСофт, Россия) в термостатированных условиях при 37 °С. 75 мкл 0,05 М водного раствора АБАП (Sigma) и 20 мкл 0,1 мМ люминола (Sigma) в растворе Isoton (Beckman Coulter, pH = 7,4) предварительно инкубировали в течение 20 мин при комнатной температуре в темноте при перемешивании средней интенсивности. Терморазложение АБАП инициировали добавлением 875 мкл предварительно нагретого до 37 °С раствора Isoton и регистрировали ХЛ-сигнал в течение 10 минут до выхода на плато. Исходную суспензию анализируемой *C. difficile* пропускали через фильтр с порами 20 мкм (BD) и готовили дополнительные рабочие разведения с концентрацией 1 и 2 McF. После 10-минутной инкубации системы АБАП-люминол при 37 °С в реакционную смесь вносили 100 мкл суспензии *C. difficile* или раствора Isoton в качестве контрольного опыта и регистрировали ХЛ ответ в течение 15 минут. Все эксперименты выполняли в двух параллельных постановках. Схема эксперимента приведена на рисунке 1.

Анализ первичных данных выполняли в среде PowerGraph (www.powergraph.ru, Россия); определяли светосумму ХЛ после внесения суспензии культуры за 10 минут регистрации. Для оценки АОА *C. difficile* строили линейный градуировочный график зависимости светосуммы ХЛ от концентрации суспензии бактерий и модуль углового коэффициента градуировочного графика. Контроль качества постановки выполняли на основании значений коэффициента детерминации (R^2) линейного тренда градуировочной прямой и коэффициента вариации светосуммы между параллельными пробами, при этом удовлетворительными считали результаты с $R^2 > 0,8$ и $CV < 20\%$. Пример определения АОА показан на рисунке 2.

Рисунок 1.
Пример ХЛ-граммы при анализе АОА *C. difficile*



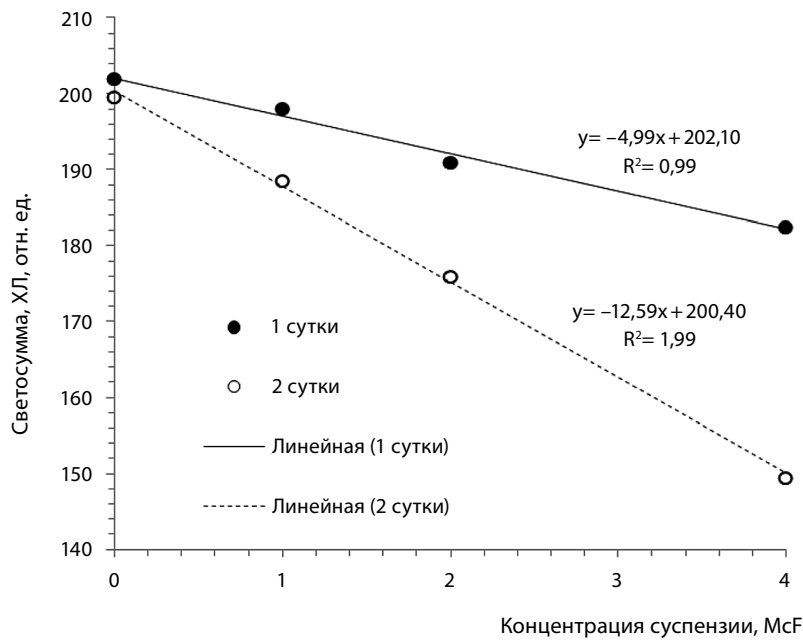


Рисунок 2. Градуировочные графики ХЛ анализа АОА для штамма 729 на первые и вторые сутки культивирования

Результаты

Предлагаемая методика характеризуется высокой воспроизводимостью. Коэффициент вариации показателей светосуммы в параллельных постановках лежит в диапазоне 2,0–18,2% (таблица 2). Среднее значение коэффициента детерминации R^2 градуировочного графика лежит в диапазоне 80,5–89,4%.

АОА обследованных штаммов после первых суток культивирования составляет в среднем 8,44 (6,95–9,93) единиц, медиана 8,29, после вторых суток – 11,56 (9,86–13,27), медиана 10,96. После вторых суток культивирования АОА достоверно повышается ($p < 0,05$). При этом темп роста АОА составляет

110,9–185,7%. Выявлена отрицательная корреляция ($\eta = -0,3$, $p < 0,05$) между исходным уровнем АОА и темпом её роста в процессе культивирования.

Все обследованные штаммы характеризуются продукцией токсинов А и В. При сопоставлении уровня АОА в первые сутки культивирования и минимальной подавляющей концентрации (МПК) фидаксомицина выявлена сильная положительная корреляция между этими показателями ($\eta = 0,85$, $p < 0,01$). Средняя МПК фидаксомицина составляла 0,03–0,09 мг/л. Зависимость между АОА и резистентностью к фидаксомицину представлена на рисунке 3.

Точка	Контроль	1 МсФ	2 МсФ	4 МсФ
Диапазон вариации,%	2,0–4,0	10,7–18,2	3,6–5,7	10,2–17,7

Таблица 2 Доверительный интервал ($p < 0,05$) для коэффициента вариации в параллельных постановках

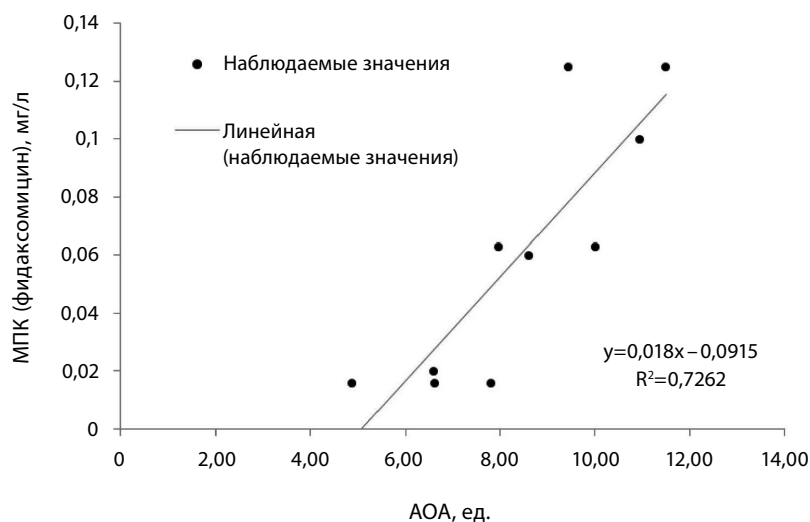


Рисунок 3. Зависимость между АОА и резистентностью к фидаксомицину. Показан линейный тренд и коэффициент детерминации R^2 .

Обсуждение

АОА *C. difficile* представляет собой малоизученный аспект физиологии возбудителя, обладающий, тем не менее, высокой клинической значимостью. К факторам, способствующим проявлению антиоксидантных свойств, следует отнести спектр внутриклеточных ферментов, ответственных за метаболизацию АФК: СОД, каталазы и пероксидазы. Прямая оценка этих ферментов весьма затруднительна в рутинной практике, поскольку подразумевает либо выделение и очистку белков, либо исследование транскрипта. Поэтому предлагаемый способ, заключающийся в выполнении функционального тестирования культуры *C. difficile*, является весьма привлекательным для клинической бактериологии, так как он основан на прямой количественной оценке антиоксидантного потенциала конкретного штамма и характеризуется хорошей воспроизводимостью и экономичностью. Кроме

того, при выполнении методики отсутствует субъективный фактор работы оператора.

Наблюдаемое усиление АОА *C. difficile* может быть связано с динамикой роста колоний. Построение зависимости АОА от фазы роста представляет собой направление дальнейшего исследования. Значимость АОА в качестве фактора патогенности возбудителя велика, поскольку штаммы, более интенсивно метаболизирующие АФК, способны лучше сохраняться в условиях аэробной атмосферы в виде спор, а также препятствовать эффективной бактерицидности фагоцитов организма-хозяина, подавляя их кислород-зависимую цитотоксичность. Особый интерес представляет показанная в работе корреляция между АОА и резистентностью к фидаксомицину, свидетельствующая о возможной ассоциации между различными факторами патогенности.

Заключение

Антиоксидантная активность, наряду со спорообразованием, обуславливает эффект аэротолерантности облигатно анаэробной *C. difficile*, выживаемость ее вегетативных форм, что в свою очередь определяет распространение возбудителя в окружающей среде. Знание уровня антиоксидантной активности *C. difficile* позволит применить эффективные подходы санитарно-эпидемиологического

режима в стационаре и предотвратит персистенцию возбудителя в больничной среде. Таким образом, авторами предложен простой и надёжный способ оценки антиоксидантной активности *C. difficile*, пригодный для рутинного применения в клинической микробиологии, позволяющий характеризовать патогенность изолированных штаммов *C. difficile*.

Литература | References

1. Durovic A., Widmer A. F., Tschudin-Sutter S. New insights into transmission of Clostridium difficile infection-narrative review. // Clin Microbiol Infect. – 2018. – Т. 24. – № 5. – С. 483–492
2. Rineh A., Kelso M. J., Vatansever F. et al. Clostridium difficile infection: molecular pathogenesis and novel therapeutics. // Expert Rev Anti Infect Ther. – 2014. – Т. 12. – № 1. С. 131–150
3. Weese J. S., Staempfli H. R., Prescott J. F. Survival of Clostridium difficile and its toxins in equine feces: implications for diagnostic test selection and interpretation. // J Vet Diagn Invest. – 2000. – Т. 12. – № 4. С. 332–336
4. 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.
Brioukhanov A. L., Netrusov A. I. Aerotolerance of strictly anaerobic microorganisms and factors of defense against oxidative stress: A review. Applied Biochemistry and Microbiology. 2007, vol. 43, no. 6, pp. 635–652.
5. Сафин А. Л., Ачкасов С. И., Сухина М. А., Сушков О. И. Clostridium difficile инфекция: клиника, диагностика и лечение (обзор литературы) // Колопроктология. – 2017. – Т. 60. – № 2. – С. 80–88.
Safin A. L., Achkasov S. I., Sukhina M. A., Sushkov O. I. Clostridium difficile infection: clinic, diagnostics and treatment (review). Koloproktologia. 2017, Vol. 60, no. 2, pp. 80–88.
6. Сухина М. А., Сафин А. Л. Clostridium difficile ассоциированная инфекция // Колопроктология. – 2016. – № 2. – С. 120–121.
Sukhina M. A., Safin A. L. Clostridium difficile associated infection. Koloproktologia. 2016, Vol. 56, no. 2, pp. 120–121.
7. Владимиров Ю. А., Проскурнина Е. В. Свободные радикалы и клеточная хемилюминесценция. // Успехи биологической химии. – 2009. – Т. 49. – С. 341–388
Vladimirov Yu. A., Proskurnina E. V. Free radicals and cellular chemiluminescence. Advances in Biological Chemistry. 2009, vol. 49, pp. 341–388.
8. Permpoonpattana P., Tolls E. H., Nadem R. et al. Surface layers of Clostridium (Clostridioides) difficile endospores. // J Bacteriol. – 2011. – Т. 193. – № 23. – С. 6461–6470
9. Fraga C. G., Oteiza P. I., Galleano M. In vitro measurements and interpretation of total antioxidant capacity. // Biochim Biophys Acta. – 2014. – Т. 1840. – № 2. – С. 931–934
10. Becker K., Schroecks-nadel S., Gostner J. et al. Comparison of in vitro tests for antioxidant and immunomodulatory capacities of compounds. // Phytomedicine. – 2014. – Т. 21. – № 2. – С. 164–71
11. Владимиров Г. К., Сергунова Е. В., Измайлов Д. Ю., Владимиров Ю. А. Хемилюминесцентная методика определения общей антиоксидантной емкости в лекарственном растительном сырье. // Вестник Российского государственного медицинского университета. – 2016. – Т. 2. – С. 65–72.

- Vladimirov G. K., Sergunova E. V., Izmaylov D. Yu., Vladimirov Yu. A.* Chemiluminescent determination of total antioxidant capacity in medicinal plant material. Bulletin of RSMU. 2016, no.2, pp. 65–72.
12. *Измайлов Д. Ю., Демин Е. М., Владимиров Ю. А.* Определение активности антиоксидантов методом измерения кинетики хемилюминесценции. // Фотобиология та Фотомедицина. – 2011. – Т. VIII. – № 2. – С. 70–76.
- Izmailov D. Yu., Demin E. M., Vladimirov Yu. A.* The determination of the antioxidants activity by measuring of the chemiluminescence kinetics. Photobiology and Photomedicine. 2011, Vol. VIII, no. 2, pp. 70–76.
13. *Владимиров Ю. А., Проскурнина Е. В., Измайлов Д. Ю.* Кинетическая хемилюминесценция как метод изучения реакций свободных радикалов. // Биофизика. – 2011. – Т. 56. – № 6. – С. 1081–1090.
- Vladimirov Y. A., Proskurnina E. V., Izmajlov D. Yu.* Kinetic chemiluminescence as a method for study of free radical reactions. Biofizika, 2011, Vol. 56, No. 6, pp. 1081–1090.
14. *Созарукова М. М., Полимова А. М., Проскурнина Е. В., Владимиров Ю. А.* Изменения в кинетике хемилюминесценции плазмы как мера системного окислительного стресса в организме человека. Биофизика. – 2016. – Т. 61. – № 2. – С. 337–344.
- Sozarukova M. M., Polimova A. M., Proskurnina E. V., Vladimirov Yu. A.* Changes in the kinetics of plasma chemiluminescence as a measure of systemic oxidative stress in humans. Biofizika, 2016, Vol. 61, No. 2, pp. 337–344.