

Н. М. Замалютдинова, Л. Ф. Миннуллина, А. Г. Гиляева,
Е. О. Михайлова, М. Р. Шарипова, Н. Л. Рудакова, А. М. Марданова

ВЛИЯНИЕ ГЛЮКОЗЫ И МОЧЕВИНЫ НА РОСТ *PROTEUSMIRABILIS* И БИОСИНТЕЗ ВНЕКЛЕТОЧНОЙ ПРОТЕИНАЗЫ

Ключевые слова: *Proteus mirabilis*, металлопротеиназы, глюкоза, биосинтез.

Исследовали рост *P. mirabilis* и продуктивность внеклеточных металлопротеиназ при моделировании условий глюкозурии (диабет легкого типа). Показано, что при добавлении 1.5% глюкозы в среду культивирования происходит полное подавление биосинтеза внеклеточных металлопротеиназ. Глюкоза также подавляет рост клеток, что может быть связано с накоплением в среде кислых продуктов и значительного снижения pH среды. Присутствие мочевины в среде культивирования подавляет закисляющий эффект глюкозы и повышает продуктивность внеклеточных протеиназ.

Keywords: *Proteus mirabilis*, metallopeptases, glucose, biosynthesis.

The paper describes the study of *P. mirabilis* growth and production of extracellular metalloproteases under modeling glycosuria conditions (diabetes light type). It was shown that addition of 1.5% glucose into a culture medium results in a full suppression of extracellular metalloproteases biosynthesis. Glucose also inhibits bacterial cell growth that could be associated with an accumulation of acidic products in the medium and significant pH decrease of the medium. The presence of urea in the culture medium inhibits the acidifying effect of glucose and enhances extracellular proteases productivity.

Введение

Бактерии семейства *Enterobacteriaceae* являются наиболее распространенными возбудителями различных инфекций мочевыводящих путей и часто выделяются у больных с бессимптомной бактериурией. К одним из таких возбудителей относится *Proteus mirabilis* [1, 2], который также является частой причиной образования камней в почках и мочевом пузыре у людей с ослабленным иммунитетом [3]. Основным фактором патогенности этого микроорганизма является его способность инвазировать в эукариотические клетки, секретировать гемолизины, уреазу и другие ферменты [4]. Известно, что клетки *P. mirabilis* выделяют в среду металлопротеиназу, которая играет важную роль в патогенезе инфекций, вызванных этой бактерией [5,6]. Также из литературы известно, что синтез многих протеолитических ферментов регулируется углеродной катаболической репрессией, то есть подавляется в присутствии легко метаболизируемых источников углерода, например, глюкозы [7]. Сахарный диабет – группа эндокринных заболеваний, развивающихся вследствие абсолютной или относительной недостаточности гормона инсулина, в результате чего развивается гипергликемия – стойкое увеличение содержания глюкозы в крови и в моче [8]. При данном заболевании возможно развитие такого состояния как бессимптомная бактериурия [9]. Антибактериальная терапия не приводит к снижению количества бактерий или снижению заболеваемости мочеполовых путей и потенциально может привести к побочным эффектам – появлению резистентных микроорганизмов [10].

Целью данной работы является изучение роста *P. mirabilis* и биосинтеза внеклеточных протеиназ в условиях, моделирующих сахарный диабет.

Материалы и методы исследования

Штамм *Proteus mirabilis* 5127-1 предоставлен для работы проф. Т. Адамом, Институт Микробиологии и гигиены, Charite, Берлин. Бактерии культивировали при 37°C с интенсивностью качания 200 об/мин (вибростенд, В. Braun, Германия). В качестве инокулята использовали 12 час культуру, выращенную на среде LB [11] (%): триптон - 1.0, дрожжевой экстракт - 0.5, NaCl - 0.5, pH 8.5. Среда LBA содержала 2% агара. Мочевину в конечных концентрациях 4–600 мМ вносили в питательную среду перед посевом в виде стерильных растворов. Глюкозу в конечной концентрации 0.5-1.5% вносили в питательную среду перед посевом в виде стерильных растворов.

Определение общего количества белка проводили по методу М. Брэдфорда [12].

Прирост биомассы измеряли нефелометрически на фотоэлектрокалориметре КФК-2 при длине волны 590 нм. Количество биомассы выражали в единицах светопоглощения в кювете толщиной 1 см.

Культуральную жидкость получали путем центрифугирования культуры при 15000 об/мин в течение 5 мин. Супернатант отбирали и замораживали до использования.

Расщепление азоказеина проводили по методу [13]. За единицу активности принимали такое количество активности, которое приводит к повышению поглощения на 0,1 единицы.

Протеолитическое расщепление актина проводили по методу, описанному в работе [14].

Для электрофореза белков в ПААГ в присутствии додецилсульфата натрия использовали стандартную методику [15].

Анализ культуральной жидкости *P. mirabilis* на газо-жидкостном хроматографе (Кристаллюкс-4000М с капиллярной колонкой) проводили в отделе

химии окружающей среды Химического института им. А.М. Бутлерова. Объем вносимой пробы был равен 2мкл. Газом-носителем служил гелий. Детектор пламенно-ионизационный. Компоненты характеризовались по времени удерживания. Внутренним стандартом являлся метанол.

Математическую обработку данных проводили в программной среде «Microsoft Excel» путем расчета среднеквадратичного отклонения (σ). Результаты считали достоверными при среднеквадратичном отклонении $\sigma \leq 15\%$. В качестве критерия достоверности получаемых разностей использовали критерий Стьюдента, принимая $P < 0.05$ за достоверный уровень значимости.

Результаты исследований и их обсуждение

Мы исследовали рост *P. mirabilis* продуктивность внеклеточных металлопротеиназ, моделируя условия глюкозурии при диабете легкого типа. Для этого в среду LB вносили глюкозу в концентрации 1.5%. По данным литературы различают три степени (формы) тяжести истинного сахарного диабета. Одним из основных критериев при оценке степени тяжести диабета остается уровень гликемии и глюкозурии. Легкая (I степень) форма болезни характеризуется невысоким уровнем гликемии, которая не превышает 8 ммоль/л натощак, когда нет больших колебаний содержимого сахара крови на протяжении суток, незначительная суточная глюкозурия (от следов до 20 г/л) [8].

На рисунке 1 показана оптическая плотность культуры бактерий на среде с глюкозой и без нее на 16 час роста. Как видно из рисунка, в присутствии глюкозы рост бактерий был ниже на 35-40%, чем на среде LB. На рисунках 2 и 3 представлены результаты определения протеолитической активности в культуральной жидкости на среде с глюкозой и без глюкозы по расщеплению азоказеина (рис.2) и актина (рис. 3). Ранее было показано, что пик внеклеточной протеолитической активности приходится на 16 час культивирования. Поэтому протеолитическую активность в присутствии глюкозы определяли в культуральной жидкости на 16 час роста. Как видно из рисунков 2 и 3, протеолитическая активность по отношению актина и азоказеина полностью подавляется в присутствии 1,5% глюкозы в среде.

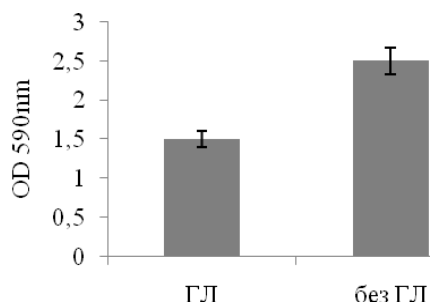


Рис. 1– Рост культуры *P. mirabilis* на среде LB с 1.5% глюкозой и без неё. 16 час культивирования

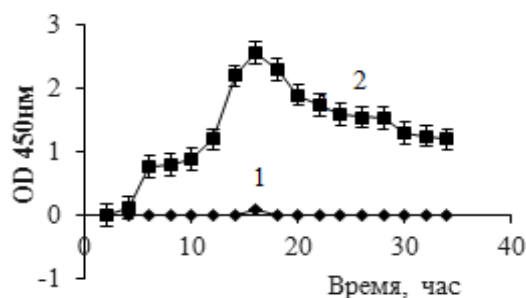


Рис. 2 – Расщепление азоказеина внеклеточными протеиназами *P. mirabilis* на среде LB с 1,5% глюкозой (1) и без (2)

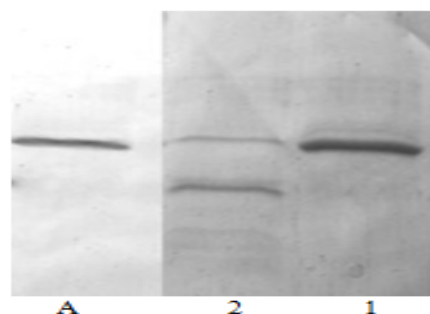


Рис. 3 – Расщепление актина внеклеточными протеиназами *P. mirabilis* на 16 час культивирования на среде LB с 1.5% глюкозы (1) и без глюкозы (2). А – актин

Таким образом, при добавлении 1.5% глюкозы в среду культивирования происходит полное подавление биосинтеза внеклеточных металлопротеиназ *P. mirabilis*.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что биосинтез внеклеточных протеиназ *P. mirabilis* регулируется по типу углеродной катаболитной репрессии. Для того чтобы выявить зависимость биосинтеза внеклеточных протеиназ от концентрации глюкозы, мы исследовали протеолитическую активность в среде в условиях культивирования бактерий в присутствии 0.5, 1 и 1.5% глюкозы. Показано, что уже при содержании 0.5% глюкозы в культуральной жидкости полностью отсутствует внеклеточная протеолитическая активность. Таким образом, даже при низких концентрациях глюкозы происходит ингибирование биосинтеза металлопротеиназ по типу углеродной катаболитной репрессии.

При выращивании бактерий *P. mirabilis* на среде LB с добавлением глюкозы нами было отмечено наряду с ингибированием роста культуры на 30-35% также резкое изменение в цвете и запахе культуральной жидкости бактерий. Подавление роста бактерий может быть связано с появлением некоторых метаболитов в среде культивирования в присутствии глюкозы. Для выяснения этого вопроса был проведен сравнительный анализ с помощью газо-жидкостной хроматографии внеклеточных метаболитов *P. mirabilis*, культивированных на среде с глюкозой и без. В таблице 1 представлены данные по анализу основных пиков. Обнаружены

различия в количестве и составе секретируемых С-продуктов. Как видно из таблицы 1, в случае культивирования бактерий на среде с глюкозой в среде обнаружено 7 основных пиков С-продуктов, в то время как на среде без глюкозы - 10 пиков. Анализ пиков показал, что на среде с глюкозой образуются С5-продукты, отсутствующие на контрольной среде.

Таблица 1 - Анализ основных пиков, полученных при газо-жидкостной хроматографии культуральной жидкости *P. Mirabilis*

Время выхода, сек	С-продукт	Наличие продукта в среде роста	
		1,5% глюкозы	Без глюкозы
2.19	C2-C3	-	+
2.26	C2-C3	-	+
2.38	C2-C3	+	+
2.44	C2-C3	-	+
2.53	C2-C3	-	+
2.59	C2-C3	-	+
2.72	C3-C4	+	-
2.81	C3-C4	+	+
2.82	C3-C4	-	+
3.02	C3-C4	+	-
3.07	C3-C4	+	-
3.22	C3-C4	+	+
3.29	C3-C4	-	+
3.51	C4-C5	+	-

Поскольку *P. mirabilis* часто колонизирует мочевыводящие пути, было интересно исследовать биосинтез внеклеточных протеиназ и рост бактерий в присутствии глюкозы и разных концентраций мочевины. Проводили культивирование бактерий в присутствии мочевины (10 - 600 мМ) и 1,5% глюкозы. Контрольной средой служила среда LB с мочевиной без добавления глюкозы. В норме содержание мочевины в моче у взрослого человека достигает 400–700 мМ/л [16].

Показано, что рост протеев в присутствии мочевины в концентрации 90-100 мМ падает на 50-60% на среде без глюкозы по сравнению со средой, содержащей 1,5% глюкозы (таблица 2). При увеличении концентраций мочевины до 300 и 600 мМ происходит снижение роста как на среде с глюкозой, так и на среде без неё. При концентрации мочевины 600 мМ рост бактерий одинаков на обеих средах. Таким образом, при низких концентрациях мочевины (90-100 мМ) глюкоза снижает ингибирующий эффект мочевины на рост бактерий. Продуктивность на среде, содержащей 20-300 мМ мочевины, возрастает в 1.5-2.0 раза по сравнению с контролем (среда LB). 300 мМ мочевины, значительно подавляя рост культуры, приводит к повышению продуктивности протеиназ в 2.5 раза. Одновременно мочевина частично снимает эффект катаболитной репрессии в отношении синтеза внеклеточных протеиназ. В среде с 300 мМ мочевины и 1.5 % глюкозы продуктивность только на 30% ниже контроля, а на среде с 600 мМ

мочевины и 1.5% глюкозы продуктивность была на уровне контроля.

Таблица 2 - Рост бактерий *P.mirabilis* на 16 час культивирования на среде LB с мочевиной в присутствии 1.5% глюкозы и без неё

Мочевина, мМ	Рост, ОД ₅₉₀	
	LB	LB+глюкоза
0	2,5	1,5
80	1.75	2.0
90	1.5	2.2
100	1.5	2.7
300	0.5	0.65
600	0.3	0.3

Как сказано выше, рост *P. mirabilis* на среде LB в присутствии 1.5% глюкозы ниже, чем на контрольной среде LB (рис.1). Причина снижения роста бактерий в присутствии глюкозы может быть связана с образованием продуктов метаболизма, значительно снижающих pH среды.

В 1984 году Fromtling, изучая влияние pH и концентрации глюкозы на антибактериальную активность норфлоксацина в моче *invitro*, показал, что он эффективно подавляет рост грам-отрицательных микроорганизмов в моче *invitro* при значениях pH 6.0, 7.0 и 8.0. Антибактериальная активность норфлоксацина в моче снижается в несколько раз при pH 6.0, но минимальная ингибирующая концентрация (МИК) остается клинически значимой. Глюкоза в концентрации 200 мг/дл и 400 мг/дл (имитация глюкозурии при диабете) подавляет антибактериальную активность норфлоксацина при тестировании клинических изолятов *E.coli*, *P.mirabilis*, *Klebsiellapneumonia* [17].

Исследовали изменение pH в среде культивирования в зависимости от присутствия различных концентраций мочевины и 1.5% глюкозы. pH в культуральной среде определяли на 16 час роста (рисунок 4). Исходная среда LB имела pH 7.4. На среде без глюкозы и мочевины pH культуральной жидкости повышался к 16 часу роста до 8.7. В присутствии мочевины в концентрациях от 20 до 600 мМ pH среды повышался до 10.0. Таким образом, мочевина в среде приводит к подщелачиванию культуральной жидкости в процессе роста бактерий. В тоже время внесение в среду 1.5% глюкозы приводит к значительному снижению pH среды (с 7.4 до 4.7) в процессе роста бактерий. Это и может быть одной из причин подавления роста культуры на 35-40% в присутствии глюкозы. Поскольку нами было показано, что мочевина способна подщелачивать среду культивирования, исследовали изменение pH среды при совместном внесении мочевины в различных концентрациях и 1.5% глюкозы. Добавление в среду LB с 1.5% глюкозой мочевины в концентрациях 20-70 мМ не повышало pH среды (4.8-5.45). Однако при высоких концентрациях мочевины (100-600 мМ) pH среды либо оставался на исходном уровне (7.4-7.5), либо повышается до 9.2. По-видимому, мочевина в высоких концентрациях

нейтрализует кислые продукты метаболизма глюкозы.

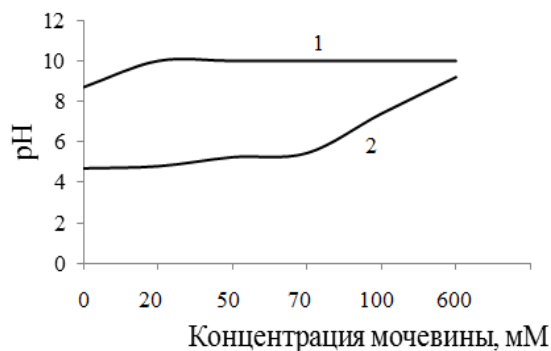


Рис. 4 - Влияние мочевины и глюкозы на pH культуральной жидкости *P.mirabilis* на 16 час культивирования. 1 – LB, 2 – LB + 1.5% глюкозы

Таким образом, рост бактерий *P.mirabilis* и биосинтез внеклеточных протеиназ зависит от присутствия в среде культивирования глюкозы и мочевины. Глюкоза подавляет биосинтез внеклеточных протеиназ бактерий по типу катаболитной репрессии. Также глюкоза подавляет рост клеток, что может быть связано с накоплением в среде кислых продуктов и значительным снижением pH среды. Присутствие мочевины в среде культивирования подавляет закисляющий и ингибиторный эффект глюкозы и повышает продуктивность культуры в отношении биосинтеза внеклеточных протеиназ.

Работа поддержана Федеральной целевой программой «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2012-2013 гг. соглашение № 14.А18.21.1118.

Литература

1. L.E. Nicolle, *Infect. Dis. Clin. North. Am.*, **17**, 367-394 (2003).
2. A. Papazafropoulou, I. Daniil, A. Sotiropoulos, E. Balampani, A. Kokolaki, S. Bousboulas, S. Konstantopoulou, E. Skliros, D. Petropoulou, S. Pappas, *BMC. Research. Notes*, **3**, 169 (2010).
3. D. Juyal, V. K. Rathaur, N. Sharma, *J.Clin.Diagn. Res.*, **7**, 369-370 (2013).
4. M.M. Pearson, M. Sebaihia, C. Churcher, M. A. Quail, A.S. Seshasayee, N. M. Luscombe, et al., *J Bacteriol.*, **190**, 4027-4037 (2008).
5. Н.М.Замалютдинова, И.Р. Галиева, А.О.Арапова, Е.О. Михайлова, М.Р. Шарипова, А.М.Марданова, *Вестник Казанского технологического университета*, **16**, 191-195 (2013).
6. K. Shigemura, K. Tanaka, T. Haraguchi, F. Yamamichi, M. Muramaki, H. Miyake, M. Fujisawa, *Korean J Urol.*, **54**, 189-93 (2013).
7. Y. Fujita, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **73**, 245-259 (2009).
8. A. Everard, P.D. Cani, *Best Pract Res ClinGastroenterol.*, **27**, 73-83 (2013).
9. V. T. Andriole, *N. Engl. J. Med.*, **347**, 1617-1618 (2002).
10. Y. Ariathianto, *Reprinted from Australian Family Physician*, **40**, 10, 805-809 (2011).
11. J. Sambrook, E.F. Fritsch, S.T. Maniatis, *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY, 1989, 2344 p.
12. M. M. Bradford, *Anal. Biochem.*, **72**, 248-254 (1976).
13. C. Wassif, D. Cheek, R. Belas, *J. Bacteriol.*, **177**, 20, 5790-5798 (1995).
14. S.Yu. Khaitlina, J.H. Collins, I.M. Kuznetsova, V.P. Pershina, J.K. Sambrook, in *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY, 1989, 2344 p.
15. U.K. Laemmli, *Nature (London)*, **227**, 680-685 (1970).
16. C. Czoski-Murray, M. Lloyd Jones, C. McCabe, K. Claxton, Y. Oluboyede, J. Roberts, J.P. Nicholl, A. Rees, C.S. Reilly, D. Young, T. Fleming, *Health Technol Assess*, **16**, 50, 1-159 (2012).
17. R.A. Fromtling, G.K. Abruzzo, H.H. Gadebusch, *Methods Find Exp. Clin. Pharmacol.*, **6**, 12, 731-735 (1984).

© Н. М. Замалютдинова – асп. каф. микробиологии К(П)ФУ, zamalutdinova@rambler.ru; Л. Ф. Миннулина – студ К(П)ФУ; А. Г. Гиляева – студ К(П)ФУ; Е. О. Михайлова – к.б.н., доц. каф. БСМЭ КНИТУ, katyushka.glukhova@gmail.com; М. Р. Шарипова – д.б.н., проф. каф. микробиологии К(П)ФУ, marsharipova@gmail.com; Н. Л. Рудакова – к.б.н., н.с. каф. микробиологии К(П)ФУ; А. М. Марданова – доц. каф. микробиологии К(П)ФУ.