

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 катаболитной 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, V.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.Брэдфорд [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 «MicrosoftExcel» путем расчета среднеквадратичного отклонения (s). Результаты считали достоверными при среднеквадратичном отклонении $s \leq 15\%$. 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* и 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 содержания 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.

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 мочевины частично снимает эффект катаболической 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, ОД590	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*, *Klebsiella pneumoniae* [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, мочевины 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 мочевины 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, мочевины 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.