

УДК 579.083.13

Н. В. Белоногова, А. Б. Маргулис, В. Я. Пономарев,
А. И. Колпаков, О. Н. Ильинская

ГОМОСЕРИНЛАКТОН КАК МОДУЛЯТОР ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ КЛЕТОК ПРОКАРИОТ

Ключевые слова: гомосеринлактон, *Staphylococcus aureus*, тепловой шок, ферментативная активность.

Исследовано влияние гомосеринлактона на устойчивость Staphylococcus aureus к тепловому шоку. Показано, что предобработка стафилококка гомосеринлактоном не влияет на лецитиназную активность, но приводит к повышению устойчивости протеаз и к повышению чувствительности гемолизина при действии теплового шока.

Keywords: homoserine lactone, *Staphylococcus aureus*, heat stress, enzymatic activity.

The effect of homoserine lactone on Staphylococcus aureus resistance to heat stress is studied. Shown that pretreatment of Staphylococcus aureus by homoserine lactone does not affect the lecithinase activity, but leads to increased stability of proteases and sensitization of hemolysins by the action of heat stress.

Введение

Золотистый стафилококк часто входит в состав нормальной микрофлоры человека. Носителями стафилококка являются 15-30% клинически здоровых лиц, причем встречается как ограниченное неделями или месяцами носительство, так и хроническое носительство, типичное для персонала медицинских учреждений и некоторых пациентов. Подавляющее число стафилококковых инфекций носит эндогенный характер, связанный с активацией аутомикрофлоры [1]. Этот факт подчеркивает безусловную важность исследований, связанных с возможностью направленной регуляции интенсивности жизнедеятельности такого рода бактерий.

Стрессовые условия возникают, когда значения тех или иных параметров среды выходят за пределы нормы. Растущие клетки испытывают множество различных стрессов, влияющих на их биохимическую активность. Существование клетки можно описать как совокупность адаптированных состояний. С увеличением влияния стрессовых условий на микробные клетки изменения в них могут быть качественными (экспрессия новых активностей) и количественными (изменение баланса уже действующих систем). В ответ на стрессовые условия часто возрастает активность тех же ферментов, которые функционируют в нормальных условиях. Пределы этой нормы неодинаковы для различных организмов [2].

Когда клетки бактерий или любого другого организма подвергаются тепловому шоку, мгновенно активируется группа генов, кодирующих белки теплового шока (БТШ). Первичная структура БТШ весьма консервативна, и они выполняют аналогичные функции во всех организмах. Большинство БТШ принадлежат к двум классам: молекулярным шаперонам и АТФ-зависимым протеазам. В большинстве случаев шапероны и протеазы работают вместе. Шапероны обеспечивают правильное конформационное

сворачивание белков, а протеазы разрушают белки с неправильной третичной структурой [3]. Все гены теплового шока при нормальной температуре экспрессируются на остаточном уровне, при тепловом шоке экспрессия мгновенно возрастает на уровне транскрипции [4].

Известно, что класс соединений ацилированных лактонов гомосерина (АГЛ) проявляет свое действие на биологических и экологических уровнях организации. Несмотря на тот факт, что производят АГЛ немногие роды прокариот, представители этих родов широко распространены в окружающей среде и представляют большой интерес для человека. АГЛ осуществляют как межклеточную коммуникацию внутри одного вида бактерий, так и межвидовую коммуникацию, а также взаимодействие между бактериями и высшими организмами. Понимание биологической активности АГЛ и экологических последствий такой деятельности может дать нам возможность манипулировать составом и функциями сложных биологических комплексов. В конечном итоге это расширяет биотехнологическую значимость исследований АГЛ для ослабления вирулентности патогенов человека, животных и растений [5].

Настоящая работа была посвящена выяснению механизмов устойчивости *Staphylococcus aureus* к тепловому шоку при действии ацилированного гомосеринлактона.

Материалы и методы исследования

В работе применяли ацилированный гомосеринлактон (N-гексаноил-DL-гомосеринлактон, М.в.=199,25) производства «BioChemika Fluka» в концентрации 50мкг/мл. Вещество растворяли в диметилсульфоксиде, конечная концентрация растворителя в среде не превышала 3%.

Использовали штамм *Staphylococcus aureus* – клинический изолят с высокой гемолитической

активностью. Культуру стафилококка выращивали в течение 18 часов на мясопептонном бульоне (МПА) при 37°C.

Затем проводили высеv на мясопептонный агар для определения числа колониеобразующих единиц (КОЕ). Кроме того, высеv проводили на специальные диагностические среды для определения ферментативной активности стафилококка.

Для определения гемолитической активности использовали кровяной агар с добавлением 5% суспензии эритроцитов барана. О величине общей гемолитической активности судили по размеру зон гемолиза вокруг колоний *S. aureus* на кровяном агаре.

Для определения протеолитической активности использовали молочный агар: мясопептонный агар с добавлением 10% пастеризованного молока. О величине протеолитической активности судили по размеру зон лизиса вокруг колоний *S. aureus* на молочном агаре.

Для определения лецитиназной активности использовали желточно-солевой агар (ЖСА): мясопептонный агар с добавлением 10% NaCl и 10% суспендированного желтка (желток одного яйца суспендируют в 200 мл 0,8% NaCl). О величине лецитиназной активности судили по зонам помутнения среды вокруг колоний *S. aureus* на ЖСА.

Также определяли кривые роста обработанной и необработанной гомосеринлактоном (ГСЛ) культуры *S. aureus* при воздействии теплового шока. Измерения проводили на приборе «iEMS-Reader» в программе «Микроб-автомат» в течение 18 часов при 37°C.

Тепловой шок вызывали выдерживанием аликвоты (6 мл) 18-часовой культуры *S. aureus* при 45°C или 60°C в течение 15 минут. После теплового шока проводили высеv на плотные среды (кровяной агар, молочный агар, ЖСА, МПА) и подсчет количества клеток в камере Горяева. При оценке действия ГСЛ сравнивали сохранение колониеобразующей способности и различных ферментативных активностей у клеток, подвергнутых тепловому шоку, в следующих вариантах (а) 18-часовая культура с внесением в нее ГСЛ (50мкг/мл) и инкубированием в течение 2 часов, (б) необработанная культура.

Влияние гомосеринлактона на выживаемость стафилококка в условиях теплового стресса

Исходно для эксперимента была взята 18-часовая культура стафилококка, которая была разделена на 6 вариантов, подвергшихся дальнейшей обработке. Как видно из рисунка 1, количество клеток в контрольном варианте, с ГСЛ и при тепловом шоке 45°C с добавлением ГСЛ и без него практически не отличается. А при тепловом шоке 60°C количество клеток снижается примерно на 2 порядка. Следовательно, можно говорить о том, что тепловой шок 60°C приводит к частичному разрушению

клеток. Предобработка ГСЛ в данном случае картины не меняет. Количество клеток измеряли на приборе «iEMS-Reader» в программе «Микроб-автомат».

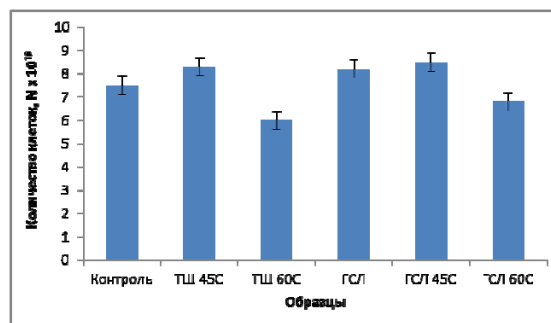


Рис. 1 – Количество клеток *S. aureus* в образцах после предобработки ГСЛ и ТШ

В результате проведенных экспериментов было показано, что тепловой шок (60°C, 15 мин) вызывает практически полную остановку деления клеток. Период адаптации при добавлении свежей питательной среды значительно превышает период лаг-фазы для клеток, подвергшихся 45°C шоку, или без воздействия температуры (рис. 2).

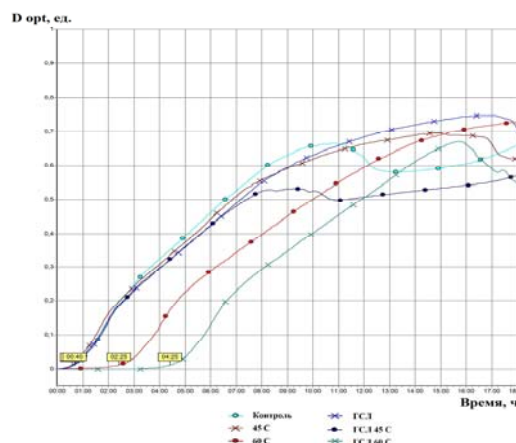


Рис. 2 – Динамика роста стафилококка на свежей среде после теплового шока 45 и 60°C с предобработкой ГСЛ и без нее

Задержка начала логарифмической фазы роста составила 1 час 45 минут по сравнению с контрольным вариантом и вариантом с 45°C температурным воздействием. Обработка гомосеринлактоном увеличила время лаг-фазы еще на 2 часа, что в целом составило 4 часа 25 минут. В то время как при тепловом шоке в 45°C задержки роста не наблюдалось и начало логарифмической фазы роста совпадало с контрольными вариантами как без обработки ГСЛ, так и с обработкой. В варианте с ТШ 45°C с предварительной обработкой ГСЛ стационарная фаза наступала раньше, чем в контрольном и других вариантах. Возможно, обработка ГСЛ приводит к образованию метаболитов, которые, разрушаясь при действии ТШ, стимулируют более ранний переход культуры в стационарную фазу роста.

Тепловой шок 45°C индуцирует увеличение числа КОЕ по сравнению с контролем, так как

происходит активизация сил организма направленных на выживание, однако колонии при этом становятся более мелкими. При обработке клеток ГСЛ мы наблюдали значительную стимуляцию роста, подтвержденную данными, полученными ранее [6-8]. При подсчете числа КОЕ на МПА в вариантах тепловой шок 60°C и 60°C с ГСЛ роста не наблюдали. Это можно объяснить тем, что происходит задержка роста культуры, что подтверждается и кривыми роста, где мы видим задержку логарифмической фазы роста при данном стрессовом воздействии.

Таким образом, в заключении можно сказать, что «жесткий» тепловой шок (60°C, 15 мин) приводит к замедлению роста культуры и частичному ее лизису. А при «мягком» тепловом шоке (45°C, 15 мин) происходит активизация ресурсов клеток микроорганизмов. Добавление ГСЛ в концентрации 50 мкг/мл является фактором, стимулирующим рост культуры.

Влияние гомосеринлактона на ферментативную активность стафилококка при тепловом стрессе

Выработка различных ферментов является основным фактором вирулентности для стафилококка. Для определения активности этих ферментов производился высеv стафилококка на молочный (протеолитическая активность), кровяной (гемолитическая активность) и желточно-солевой (лецитиназная активность) агары (табл. 1).

Таблица 1 - Ферментативная активность стафилококка на различных диагностических средах

Вариант	Молочный агар	Желточно-солевой агар	Кровяной агар
	Протеолитическая активность	Лецитиназная активность	Гемолитическая активность
Контроль	+++	+++	+++
45°C	+	+++	+++
60°C	-	-	+++
ГСЛ	+++	+++	+++
ГСЛ 45°C	+++	+++	+
ГСЛ 60°C	+++	-	+

+++ - активность высокая; + - активность низкая;
 -- активность отсутствует.

При высеvе стафилококка на молочный агар наблюдали снижение протеолитической активности при тепловом шоке 45°C, при 60°C протеолитическая активность отсутствовала. В вариантах, обработанных ГСЛ, не происходило снижение протеолитической активности при тепловом шоке. Следовательно, ГСЛ оказывает протекторное действие на клетки стафилококка.

При высеvе на желточно-солевой агар наблюдали отсутствие лецитиназной активности при тепловом шоке 60°C и 60°C с ГСЛ. В остальных вариантах активность была высокой. Вероятно, ГСЛ не влияет на изменение лецитиназной активности, а ее подавление происходит за счет «жесткого» теплового стресса.

Особенно важными факторами патогенности стафилококка являются гемолизины – ферменты, вызывающие полный гемолиз кровяных сред. В вариантах: контрольный, ГСЛ, тепловой шок 45°C и 60°C гемолитическая активность была высокой. А в вариантах тепловой шок с ГСЛ - низкой.

Таким образом, нами показано, что ацилированный ГСЛ демонстрирует комплексное и неоднозначное воздействие на физиолого-биохимические характеристики *Staphylococcus aureus*. Тепловой шок 60°C (15 минут) приводит к частичному разрушению клеток стафилококка. ТШ 45°C с предварительной обработкой ГСЛ вызывает более раннее наступление стационарной фазы роста культуры, что, вероятно, связано с накоплением токсичных метаболитов. Двухчасовая предобработка стафилококка гомосеринлактоном перед ТШ не влияет на лецитиназную активность, но приводит к повышению устойчивости протеаз к тепловому шоку 60°C и к повышению чувствительности гемолизинов к действию ТШ, за счет чего ингибируется гемолитическая активность. Известно, что увеличение экспрессии протеиназ может приводить к снижению экспрессии гемолизинов [9], что не противоречит нашим экспериментальным данным.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ в рамках ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» (ГК 14.740.11.1040).

Литература

1. Покровский, В. И. Медицинская микробиология [Текст] / В. И. Покровский, О. К. Поздеев – Москва: ГЕОТАР Медицина, 1998. – 416с.
2. Ленглер, Й. Современная микробиология. Прокариоты [Текст] : [пер. с англ.] / Й. Ленглер, Г. Дреус, Г. Шлегель. – Москва: Мир, 2005. – 656с. – Перевод изд: *Biology of the prokaryotes* / Joseph W. Lengeler, Gerhard Dreus, Hans G. Schlegel. – Stuttgart: Blackwell Science, 1999.
3. Gottesman, S. Protein quality control: triage by chaperones and proteases [Text] / S. Gottesman, S. Wickner, MR. Maurizi // *Genes Dev.* – 1997. – V.11 – P.815–823.
4. Servant, P. Negative regulation of the heat shock response in *Streptomyces* [Text] / P. Servant, P. Mazodier // *Arch Microbiol.* – 2001. – V.176 – P.237–242.
5. Manefield, M. Acylated homoserine lactones in the environment: chameleons of bioactivity [Text] / M.

- Manefield, A. S. Whiteley // 2007.- Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. – 2007. – V.362 – No.1483 – P.1235–1240.
6. *Маргулис, А.Б.* Генотоксические эффекты микробного сигнального агента – гомосеринлактона [Текст] / А.Б.Маргулис, О.В.Бушманова, И.В.Ожиганова, А.И.Колпаков, О.Н.Ильинская // Ученые записки Казанского государственного университета.- Т.148.- Серия Естественные науки.- Кн.2.- 2006.-С.83-89.
7. *Маргулис, А.Б.* Роль внутриклеточных NO и АФК в ответе лактобацилл на сигнальные молекулы бактерий – гомосеринлактон и гексилрезорцин [Текст] / А.Б.Маргулис, Д.Р.Яруллина, А.И.Колпаков, О.Н.Ильинская // Ученые записки Казанского государственного университета. Серия Естественные науки.- 2010.- Т.152, кн.2.- С.137-144.
8. *Евтюгин, В.Г.* Электронно-микроскопическое исследование морфологических изменений клеток кишечной палочки в условиях голодового стресса [Текст] / В.Г.Евтюгин, А.Б.Маргулис, О.Н.Ильинская, М.К.Кадиров // Вестник Казанского технологического университета.- 2011.- №12.- С.167-171.
9. *Blevins, J. S.* Strain-Dependent Differences in the Regulatory Roles of *sarA* and *agr* in *Staphylococcus aureus* [Text] / J. S. Blevins, K. E. Beenken, M. O. Elasri, B. K. Hurlburt, M. S. Smeltzer // Infection and Immunity – 2002. - V. 70 - No. 2 - P. 470-480.

© **Н. В. Белоногова** – асп. каф. микробиологии К(П)ФУ, nadezhda-belonogova@yandex.ru; **А. Б. Маргулис** – канд. биол. наук, доц. той же кафедры; **В. Я. Пономарев** – канд. техн. наук, доц. каф. технологии пищевых производств КНИТУ, v.y.ponomarev@gmail.com; **А. И. Колпаков** - канд. биол. наук с.н.с., зав. лаб. НИЛ ББФ К(П)ФУ; **О. Н. Ильинская** – д-р биол. наук, проф., зав. каф. микробиологии К(П)ФУ, olga.ilinskaya@ksu.ru.