

Министерство здравоохранения Республики Беларусь  
Государственное учреждение «Республиканский научно-практический  
центр эпидемиологии и микробиологии»

## **СОВРЕМЕННЫЕ ПРОБЛЕМЫ ИНФЕКЦИОННОЙ ПАТОЛОГИИ ЧЕЛОВЕКА**

Сборник научных трудов  
Основан в 2008 году  
Выпуск 2



Минск  
«ФУАинформ»  
2009

# ОСОБЕННОСТИ ВЫЯВЛЕНИЯ ПРОТЕОЛИТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ У ШТАММОВ УСЛОВНО-ПАТОГЕННЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ

Н. С. Пыжова, В. Н. Никандров

НИИ эпидемиологии и микробиологии,  
Институт физиологии НАН Беларуси ([nikandrov@fizio.bas-net.by](mailto:nikandrov@fizio.bas-net.by)),  
Минск, Беларусь

Протеолитические ферменты являются важным условием жизнеобеспечения патогенных микроорганизмов. Кроме того, в ряде случаев протеиназы играют роль факторов или «кофакторов» патогенности последних. Эта специфическая сторона протеиназ патогенных микроорганизмов рассмотрена нами ранее [1].

Однако выявление протеолитической активности даже у сапрофитирующей микрофлоры сопряжено со значительными трудностями. Данное обстоятельство приводит к тому, что этот весьма важный фенотипический признак часто остается вне поля зрения исследователей. Между тем, определение способности гидролиза отдельных белков или активации зимогенов протеиназ (плазминогена, протромбина) используют при дифференциации видов родов *Enterobacter*, *Erwinia*, *Serratia*, *Aeromonas*, *Vibrio*, *Pasteurella*, *Proteus*, *Yersinia*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Corynebacterium*, *Nocardia*, причем по целому ряду видов этих микроорганизмов нет данных литературы [2].

Наш многолетний опыт работы свидетельствует о том, что выявление протеолитической активности у микроорганизмов, несмотря на кажущуюся простоту, достаточно сложная задача, поскольку микроорганизмы гибко изменяют свою протеолитическую систему в зависимости от условий внешней среды. Однако на протяжении ряда десятилетий традиции исследования этого признака у микроорганизмов ограничивают определение протеолитической активности по расщеплению казеина («казеиназа»), гемоглобина, желатина, фибрина. В отдельных случаях оценивают также плазминогенактиваторную или протромбинактиваторную способности и свертывание молока (сычужная активность) [3–5]. Кроме того, колоссальное число видов и штаммов условно-патогенных микроорганизмов обуславливает существование ситуации, в силу которой литература по данному вопросу весьма далека от полноты и фрагментарна.

Цель настоящего исследования — выявить условия проявления протеолитической активности оптимальные для различных видов микроорганизмов – возбудителей внутрибольничных инфекций.

**Материалы и методы.** В работе использовали 12 культур различных условно-патогенных микроорганизмов (*Schigella flexneri*, *E. coli* 25922, *E. coli* K-12, *Proteus vulgaris*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia marcescens*, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhi*, *Staphylococcus aureus* 25923, *Staphylococcus aureus*) выделенных от больных в стационарах и любезно предоставленных сотрудниками лаборатории медицинской микробиологии НИИ эпидемиологии и микробиологии.

Микроорганизмы выращивали на мясо-пептонном агаре, затем смывали биомассу 0,15 М раствором NaCl и суспензию использовали для анализа. Штаммы указанных микроорганизмов высевали также на мясо-пептонный бульон, через сутки биомассу отделяли центрифугированием при 5000 об/мин в течение 15 мин, супернатанты использовали для исследования.

Плазминогенактиваторную способность определяли по лизису плазминогенсодержащих пластин человеческого фибрина как описано ранее [6]. Протеолитическую активность определяли по лизису казеина, сывороточного альбумина, бычьего гемоглобина, желатина, человеческого фибриногена, протеина PF<sub>1</sub> или протеина PF<sub>2</sub> в тон-

ком слое агар-агара как подробно описано в предыдущей статье [6]. Концентрация белков составляла 10 г/л, агар-агара — 10 г/л. Пластины с нанесенными пробами инкубировали при 37 °С в течение 24 ч. Зоны лизиса визуализировали обработкой белок-агаровых пластин 2 н трихлоруксусной кислотой. Содержание белка определяли колориметрическим методом [7].

В работе использовали бактоагар типа «Difco» (Ferak, Германия), пирофосфат натрия, кумасси голубой G-250 (Fluka, Швейцария), адениловые нуклеотиды (Reanal, Венгрия). Фибриноген и тромбин человека были изготовлены производством РНПЦ гематологии и трансфузиологии Минздрава Республики Беларусь, казеин по Гаммерстену и желатин (для инъекций), а также другие реактивы квалификации «хч» или «чда» были производства стран СНГ, их использовали после соответствующей дополнительной очистки.

Все исследования выполнены не менее, чем 4-кратно. В целях сосредоточения внимания, прежде всего, на общих закономерностях проявления протеолитической активности результаты исследований представлены как полуколичественная характеристика, выраженная в (+) .

Результаты и обсуждение. Отмытые клетки исследованных нами культур микроорганизмов обладали слабой плазминогенактиваторной способностью, частота обнаружения которой принципиально не зависела от присутствия в реакционной системе буферного раствора, содержащего органический катион с большой буферной емкостью — трис (табл. 1).

Таблица 1

Плазминогенактиваторная способность клеток различных условно-патогенных микроорганизмов в зависимости от использованного при приготовлении пластин человеческого фибрина растворителя ( $n = 4$ )

Микроорганизм	Растворитель, pH 7,5			
	0,15 М раствор NaCl	0,01 М фосфатный буфер	0,01 М трис-HCl буфер	10 <sup>-5</sup> М пирофосфат
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	+	+	-	+
<i>E. coli</i> 25922	+	+	+	+
<i>E. coli</i> K-12	+	+	+	-
<i>Salmonella enteritidis</i>	-	3+	+	+
<i>Salmonella typhi</i>	-	+	-	-
<i>Shigella flexneri</i>	+	+	+	+
<i>Serratia marcescens</i>	+	+	+	+
<i>Proteus vulgaris</i>	-	+	-	-
<i>Proteus mirabilis</i>	-	+	-	-
<i>Staphyl. aureus</i> 25923	+	+	+	+
<i>Staphyl. aureus</i> госпитальный штамм	-	+	+	-

Примечание: здесь и далее лизис белков субстратов

(-) — отсутствует; (±) — следовый; (+) — слабый; (2+, 3+, 4+) — интенсивный.

Это при том, что патогенные стафилококки обладают стафилокиназой, активирующей плазминоген. Вместе с тем, при наличии ионов ортофосфата в реакционной системе плазминогенактиваторная способность клеток выявлена у пяти культур, у которых она в отсутствие фосфатов не регистрировалась. Особенно четко это свойство проявлялось у клеток *Salmonella enteritidis* (табл. 1). Как мы сообщали в предыдущей статье, неорганический ортофосфат (0,001–0,06 М) усиливал на 50–250% активаторную функцию всех активаторов плазминогена (особенно тканевого) [6].

Добавление же в реакционную систему неорганического пирофосфата существенно не влияло на частоту проявления плазминогенактиваторной способности клетками исследованных штаммов. Заметим, что концентрация его была невелика. Результаты, полученные в экспериментах с очищенными образцами белков активаторов плазминогена, свидетельствуют о том, что максимальный стимулирующий эффект проявлялся при концентрации этого фосфата на порядок большей [6].

Приступая к исследованиям особенностей проявления протеолитической активности микроорганизмами, мы, прежде всего, остановились на оценке проявления этого признака при величине рН близкой к нейтральной, учитывая распространенность именно этого подхода в энзимологии патогенных микроорганизмов и его относительную техническую простоту.

Ранее было показано, в целом ряде случаев добавление ионов фосфата к реакционной системе вело к заметному усилению расщепления белков-субстратов очищенными протеиназами [6]. Судя по полученным в настоящем исследовании результатам, клетки микроорганизмов слабо расщепляли человеческий фибриноген, желатин, сывороточный альбумин, казеин и особенно слабо — гемоглобин (табл. 2, 3).

Таблица 2

Расщепление белков в тонком слое агарового геля клетками различных микроорганизмов в присутствии неорганического ортофосфата ( $P_i$ , 0,01 М) или неорганического пирофосфата ( $PP_i$ , 0,01 М). Растворитель для приготовления геля — 0,01 М трис-НСl буфер рН 7,5;  $n = 4$

Микроорганизм	Контроль	+ $P_i$	+ $PP_i$	Контроль	+ $P_i$	+ $PP_i$
	<i>Фибриноген человека</i>			<i>Желатин</i>		
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	+	+	+	+	+	+
<i>E. coli</i> 25922	+	+	+	+	+	+
<i>E. coli</i> K-12	–	+	+	+	+	+
<i>Salmonella enteritidis</i>	+	+	+	+	+	+
<i>Salmonella typhi</i>	+	+	+	+	+	+
<i>Shigella flexneri</i>	+	+	+	+	+	+
<i>Serratia marcescens</i>	3+	4+	+	4+	4+	+
<i>Proteus vulgaris</i>	+	+	+	4+	4+	+
<i>Proteus mirabilis</i>	+	+	+	+	+	+
<i>Staphyl. aureus</i> 25923	+	+	+	+	+	+
<i>Staphyl. aureus</i> госпитальный штамм	–	–	–	+	+	+
	<i>Гемоглобин</i>			<i>Сывороточный альбумин</i>		
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	±	±	±	+	–	+
<i>E. coli</i> 25922	±	±	±	+	+	+
<i>E. coli</i> K-12	±	±	±	+	+	+
<i>Salmonella enteritidis</i>	±	±	±	+	+	+
<i>Salmonella typhi</i>	±	–	±	+	–	+
<i>Shigella flexneri</i>	±	±	±	+	+	+
<i>Serratia marcescens</i>	±	±	±	+	+	+
<i>Proteus vulgaris</i>	±	±	±	+	+	+
<i>Proteus mirabilis</i>	±	±	±	–	–	+
<i>Staphyl. aureus</i> 25923	+	+	+	–	–	+
<i>Staphyl. aureus</i> госпитальный штамм	+	+	+	–	–	+

Лишь *Serratia marcescens* проявляла протеолитическую активность (расщепляя казеин < человеческий фибриноген < желатин). Эта активность заметно стимулировалась ортофосфатом при расщеплении казеина или фибриногена.

В отдельных случаях: *E. coli* K-12 при расщеплении клетками фибриногена или *Proteus mirabilis* и *Staphylococcus aureus* при расщеплении клетками альбумина протеолитическая активность выявлена при добавлении орто(или пиро)фосфата (табл. 2). Однако стимулирующее протеолиз действие фосфатов проявлялось не всегда. По-

видимому, такая картина обусловлена в данном конкретном случае сложностью организации носителя протеолитической активности — переживающей микробной клетки, компоненты которой, вне сомнения, способны модифицировать действие фосфатов или же использовать их для других целей. В целом, наиболее постоянно клетки выделенных от больных культур микроорганизмов проявляли способность расщеплять желатин и казеин.

Таблица 3

Расщепление казеина в тонком слое агарового геля клетками различных штаммов микроорганизмов в присутствии неорганического ортофосфата ( $P_i$ , 0,01 М) или неорганического пирофосфата ( $PP_i$ , 0,01 М). Растворитель при приготовлении геля – 0,01 М трис-НСl буфер рН 7,5;  $n = 4$

Микроорганизм	Контроль	+ $P_i$	+ $PP_i$
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	+	+	+
<i>E. coli</i> 25922	+	+	+
<i>E. coli</i> К-12	+	+	+
<i>Salmonella enteritidis</i>	+	+	+
<i>Salmonella typhi</i>	+	+	+
<i>Shigella flexneri</i>	+	+	+
<i>Serratia marcescens</i>	+	4+	+
<i>Proteus vulgaris</i>	+	+	+
<i>Proteus mirabilis</i>	+	+	–
<i>Staphyl. aureus</i> 25923	+	+	+
<i>Staphyl. aureus</i> госпитальный штамм	+	+	+

Вместе с тем, как мы отмечали ранее, проявление эффекта биогенных фосфатов существенно зависит от белка-субстрата [6]. Действительно, расщепление фибриногена при рН 7,5 заметно усиливалось при добавлении ряда биогенных фосфатов (табл. 4). Этот эффект проявлялся в экспериментах с клетками пяти из 12 штаммов микроорганизмов. Причем различные биогенные фосфаты оказали неодинаковый эффект на протеолитическую активность упомянутых пяти штаммов.

В целом нечувствительны были клетки *Pseudomonas aeruginosa*, обоих видов *Salmonella*, а также *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus vulgaris*, *Staphyl. aureus* 25923. Фибриногенолитическая активность клеток обоих штаммов *E. coli* усиливалась при добавлении в реакционную систему лишь  $AMP$  и  $3',5'$ - $AMP$ , тогда как пирофосфат и  $AT(D)P$  ее снижали. Сходная картина отмечена и для клеток *Shigella flexneri*, однако ортофосфат угнетал их фибриногенолитическую активность, а пирофосфат такого эффекта не давал. Расщепление данного белка-субстрата клетками *Serratia marcescens* усиливалось при добавлении в реакционную систему  $ATP$  и  $AMP$ , но угнеталось в присутствии ортофосфата,  $ADP$  и обоих цикло- $AMP$ . Фибриногенолитическая активность клеток госпитального штамма *Staphyl. aureus* повышалась при добавлении в реакционную систему пирофосфата,  $AT(D)P$  и  $3',5'$ - $AMP$ . Весьма вероятно, что описываемая картина обусловлена особенностями взаимодействия использованного набора биогенных фосфатов с мембранными структурами микроорганизмов, характеризующимися различной спецификой метаболизма. В каждом конкретном сочетании «биогенный фосфат + микроорганизм» проявляется результат неоднотипных перестроек мембран и состояния связанных на поверхности клеток протеиназ.

На расщепление же фибриногена супернатантами культуральной жидкости этих штаммов биогенные фосфаты влияния не оказали (табл. 4).

Поскольку для микроорганизмов довольно характерны цистеиновые или активируемые ионами кальция протеиназы было изучено влияние 0,001 М ионов  $Ca^{2+}$  или

Mg<sup>2+</sup> или цистеина-НСI на желатинолитическую активность клеток уже упомянутых микроорганизмов, подвергнутых однократному замораживанию-оттаиванию.

Таблица 4

Расщепление фибриногена в тонком слое агарового геля клетками различных микроорганизмов при добавлении биогенных фосфатов (10<sup>-3</sup>М). Растворитель при приготовлении геля – 0,01 М трис-НСI буфер рН 7,5

Микроорганизм	Эффектор							
	Контр.	P <sub>i</sub>	PP <sub>i</sub>	АТФ	АДР	АМР	2',3'-АМР	3',5'-АМР
	<i>К л е т к и</i>							
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	+	+	+	–	+	+	+	+
<i>E. coli</i> 25922	3+	3+	+	2+	2+	4+	3+	4+
<i>E. coli</i> К-12	3+	3+	+	2+	2+	4+	3+	4+
<i>Salmonella enteritidis</i>	+	+	+	–	+	+	+	+
<i>Salmonella typhi</i>	+	+	+	–	+	+	+	+
<i>Shigella flexneri</i>	3+	+	3+	+	+	4+	+	4+
<i>Klebsiella pneumonia</i>	+	+	+	–	+	+	+	+
<i>Serratia marcescens</i>	3+	+	3+	4+	2+	4+	3+	3+
<i>Proteus vulgaris</i>	±	+	+	–	+	+	+	+
<i>Proteus mirabilis</i>	3+	+	3+	+	+	+	+	+
<i>Staphyl. aureus</i> 25923	+	+	+	–	+	+	+	+
<i>Staphyl. aureus</i> госпитальный штамм	+	+	3+	4+	3+	+	+	3+
	<i>Супернатант культуральной жидкости</i>							
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>E. coli</i> 25922	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>E. coli</i> К-12	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Salmonella enteritidis</i>	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Salmonella typhi</i>	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Shigella flexneri</i>	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Klebsiella pneumonia</i>	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Serratia marcescens</i>	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Proteus vulgaris</i>	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Proteus mirabilis</i>	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Staphyl. aureus</i> 25923	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Staphyl. aureus</i> госпитальный штамм	+	+	+	+	+	+	+	+

Проявление желатинолитической активности существенно зависело от состава используемого в реакционной системе растворителя. Во всех случаях наиболее активны были клетки *Serratia marcescens* (табл. 5). При использовании трис-НСI буфера проявлялась желатинолитическая активность *Salmonella enteritidis*. Частота проявления желатинолитической активности в трис-НСI буфере была выше в случае добавления в реакционную систему ионов Ca<sup>2+</sup> или Mg<sup>2+</sup>. Однако, в целом, принципиальных изменений желатинолитической активности, включая *Serratia marcescens*, при действии ионов Ca, Mg или цистеина не выявлено.

Поскольку отсутствие цистеиновых протеиназ в клетках исследуемых микроорганизмов маловероятно, логично также полагать, что цистеиновые или Ca<sup>2+</sup>-зависимые протеиназы синтезируются в виде неактивных зимогенов. Такие примеры известны.

Таблица 5

Влияние добавления ионов кальция, магния, цистеина ( $10^{-3}M$ ) на расщепление желатина клетками различных микроорганизмов в тонком слое агарового геля, приготовленного на различных растворителях

Микроорганизм	Контроль	+ Ca <sup>2+</sup>	+ Mg <sup>2+</sup>	+ Cys-HCl	+ Ca <sup>2+</sup> , + Mg <sup>2+</sup> + Cys-HCl
<i>0,15M раствор NaCl pH 7,5</i>					
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	+	+	+	+	+
<i>E. coli</i> 25922	+	+	+	+	+
<i>E. coli</i> K-12	-	-	-	+	-
<i>Salmonella enteritidis</i>	-	-	-	-	-
<i>Salmonella typhi</i>	-	-	-	-	+
<i>Shigella flexneri</i>	+	+	+	+	+
<i>Serratia marcescens</i>	4+	4+	4+	4+	4+
<i>Proteus vulgaris</i>	+	-	-	+	+
<i>Proteus mirabilis</i>	+	+	+	+	+
<i>Staphyl. aureus</i> 25923	-	-	-	-	-
<i>Staphyl. aureus</i> госпитальный штамм	-	+	-	-	+
<i>0,01 M трис-HCl буфер pH 7,5</i>					
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	+	+	+	+	+
<i>E. coli</i> 25922	-	+	+	-	+
<i>E. coli</i> K-12	-	-	-	-	-
<i>Salmonella enteritidis</i>	4+	4+	4+	4+	4+
<i>Salmonella typhi</i>	-	+	-	-	-
<i>Shigella flexneri</i>	+	+	+	+	+
<i>Serratia marcescens</i>	4+	4+	4+	4+	4+
<i>Proteus vulgaris</i>	-	-	+	-	-
<i>Proteus mirabilis</i>	-	+	-	-	+
<i>Staphyl. aureus</i> 25923	+	+	+	-	+
<i>Staphyl. aureus</i> госпитальный штамм	-	+	-	-	-
<i>0,01 M фосфатный буфер pH 7,5</i>					
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	+	+	+	+	+
<i>E. coli</i> 25922	+	-	+	-	+
<i>E. coli</i> K-12	-	-	-	-	+
<i>Salmonella enteritidis</i>	-	-	-	-	+
<i>Salmonella typhi</i>	-	-	-	-	+
<i>Shigella flexneri</i>	+	+	+	+	+
<i>Serratia marcescens</i>	4+	4+	4+	4+	4+
<i>Proteus vulgaris</i>	+	-	+	+	+
<i>Proteus mirabilis</i>	+	+	-	+	+
<i>Staphyl. aureus</i> 25923	+	+	+	+	+
<i>Staphyl. aureus</i> госпитальный штамм	-	+	-	-	+

На проявление желатинолитической активности в ряде случаев существенного влияния не оказало и использование в качестве растворителя фосфатного буфера. Стоит, однако, заметить, что кальциевые и магниевые соли ортофосфорной кислоты мало-растворимы в воде. Тем не менее, именно фосфатный буферный раствор способствовал проявлению желатинолитической активности всеми исследуемыми штаммами при добавлении в реакционную систему Ca<sup>2+</sup> + Mg<sup>2+</sup> + цистеин.

Более примечательны были результаты исследования расщепления протеина PF<sub>2</sub>.

Этот субстрат слабо расщеплялся протеиназами микроорганизмов при использовании в качестве растворителей 0,15 М раствора NaCl pH 7,5, 0,01 М трис-НСl буфера pH 7,5, 0,01 М фосфатного буфера pH 7,5. <sup>1</sup>Однако протеолитическая активность всех микроорганизмов заметно стимулировалась YPR-фосфатом (табл. 6).

Таблица 6

Расщепление протеина PF<sub>2</sub> в тонком слое агарового геля клетками различных штаммов микроорганизмов в присутствии YPR-фосфата. Растворитель при приготовлении геля – 0,15 М раствор NaCl pH 7,5

Микроорганизм	Концентрация YPR-фосфата, М							
	контроль	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-7</sup>	10 <sup>-8</sup>
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	±	3+	–	+	–	–	–	–
<i>E. coli</i> 25922	±	3+	3+	–	+	+	+	–
<i>E. coli</i> K-12	–	4+	+	–	+	+	+	–
<i>Salmonella enteritidis</i>	±	3+	3+	2+	2+	3+	2+	2+
<i>Salmonella typhi</i>	+	3+	4+	4+	4+	4+	4+	3+
<i>Shigella flexneri</i>	–	3+	+	–	+	+	+	–
<i>Serratia marcescens</i>	+	2+	4+	4+	4+	4+	4+	4+
<i>Proteus vulgaris</i>	+	3+	+	–	3+	–	–	–
<i>Proteus mirabilis</i>	–	3+	+	–	+	–	–	–
<i>Staphyl. aureus</i> 25923	–	3+	+	+	–	+	–	–
<i>Staphyl. aureus</i> госпитальный штамм	–	3+	–	–	–	+	+	–

Наиболее выраженный эффект наблюдался с клетками *Serratia marcescens*, *Salmonella enteritidis* и *Salmonella typhi*. Протеиназы этих микроорганизмов реагировали на YPR-фосфат даже в минимальной концентрации. Для протеиназ остальных микроорганизмов требовалась более высокая концентрация этих ионов: 10<sup>-2</sup> М.

Как видно из материалов табл. 6, даже протеолитически неактивные или практически неактивные по расщеплению этого белка-субстрата клетки *Pseudomonas aeruginosa*, обоих штаммов *E. coli* и *Staphylococcus aureus*, а также клетки *Salmonella enteritidis*, *Shigella flexneri* и *Proteus mirabilis* в присутствии YPR-фосфата проявляли выраженную способность расщеплять данный белок-субстрат. Как правило, подобная способность у клеток перечисленных микроорганизмов отмечена при максимальной концентрации фосфата. Однако для клеток *Salmonella enteritidis* появление этой способности наблюдали во всем концентрационном диапазоне эффектора. В этом плане клетки *Salmonella enteritidis* были весьма близки таковым *Salmonella typhi*, различия заключались лишь в более выраженном проявлении свойства клетками последнего вида сальмонелл.

Многочисленные данные литературы свидетельствуют о том, что для многих сапрофитирующих и патогенных микроорганизмов характерны так называемые «щелочные» протеиназы [см. например, 8].

В этой связи исследовали расщепление протеина PF<sub>2</sub> клетками вышеперечисленных культур микроорганизмов при добавлении солей ортофосфорной кислоты в реакционную систему, где белок-агаровая пластина приготовлена на 0,05 М АБНВ-буфере pH 11,0. В отсутствие ортофосфатов протеолитической активности обнаружено не было (табл. 7). В целом, она слабо стимулировалась солями ортофосфата: КН<sub>2</sub>РO<sub>4</sub> или Na<sub>2</sub>НРO<sub>4</sub> в диапазоне концентраций 0,1–0,0015 М.

Вместе с тем нельзя игнорировать тот факт, что при добавлении ортофосфатов в реакционную систему эта слабая протеолитическая активность по белку PF<sub>2</sub> обнаруживалась у клеток всех без исключения микроорганизмов. При этом именно однозамещенный фосфат калия способствовал более частому проявлению способности расщеп-



ления белка-субстрата PF<sub>2</sub> при более низких концентрациях эффектора (> 0,025 М) и даже при минимальной концентрации его. Ранее мы показали на примере расщепления желатина образцами очищенных протеиназ, что различные соли ортофосфорной кислоты оказывают на процесс неодинаковое влияние [9]. Причины этого неизвестны и нуждаются в отдельном изучении.

Таблица 7

Влияние ортофосфатов на фибринолитическую активность клеток различных условно-патогенных микроорганизмов. Растворитель при приготовлении геля – 0,05 М АВNB-буфер рН 11,0

Микроорганизм	Концентрация соли, × 10 <sup>-2</sup> М							
	контроль	10,0	5,0	2,5	1,25	0,63	0,31	0,15
	<i>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></i>							
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	–	+	+	+	+	+	+	+
<i>E. coli</i> 25922	–	±	+	+	+	+	+	+
<i>E. coli</i> K-12	–	+	+	+	+	+	+	+
<i>Salmonella enteritidis</i>	–	+	+	+	+	+	+	+
<i>Salmonella typhi</i>	–	+	+	+	–	–	–	+
<i>Shigella flexneri</i>	–	+	+	+	+	+	+	+
<i>Proteus vulgaris</i>	–	+	+	+	+	+	+	+
<i>Proteus mirabilis</i>	–	+	+	+	+	–	–	+
<i>Staphyl. aureus</i> 25923	–	+	+	+	+	–	–	+
<i>Staphyl. aureus</i> госпитальный штамм	–	+	+	+	+	–	–	+
	<i>NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></i>							
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	–	+	+	+	+	+	+	–
<i>E. coli</i> 25922	–	+	+	+	+	+	–	–
<i>E. coli</i> K-12	–	+	+	+	+	–	–	–
<i>Salmonella enteritidis</i>	–	+	+	+	+	+	–	–
<i>Salmonella typhi</i>	–	+	+	–	–	–	–	–
<i>Shigella flexneri</i>	–	+	+	+	+	+	–	–
<i>Proteus vulgaris</i>	–	+	+	+	+	–	–	–
<i>Proteus mirabilis</i>	–	+	+	+	+	–	–	–
<i>Staphyl. aureus</i> 25923	–	+	+	+	+	–	–	–
<i>Staphyl. aureus</i> госпитальный штамм	–	+	+	+	–	–	–	–

Использованный АВNB-буфер рН 11,0 — довольно щелочная среда, которая не всегда оптимальна для проявления активности протеиназ даже щелочного характера, учитывая достаточно продолжительное время реакции: 20–24 час.

В этой связи был использован указанный буферный раствор, величина рН которого была на 1,5–2,0 единицы более низкой. В этих условиях клетки и супернатанты культуральных жидкостей микроорганизмов слабо расщепляли казеин, желатин (за исключением *Serratia marcescens*), клетки большинства штаммов не расщепляли сывороточный альбумин, хотя протеиназы супернатантов культуральных жидкостей всех штаммов были наделены слабой способностью расщеплять альбумин (табл. 8).

Однако при использовании в качестве субстрата белка PF<sub>2</sub> протеолитическая активность выявлена у клеток практически всех штаммов, кроме *Klebsiella pneumoniae*. Более того, при этом отмечена выраженная протеолитическая активность и супернатантов культуральных жидкостей. Лишь в случае супернатантов культуральных жидкостей

*Klebsiella pneumonia*, госпитального штамма *Staphylococcus aureus* и *Salmonella typhi* этот признак был значительно менее демонстративен.

Таблица 8

Расщепление белков субстратов в тонком слое агарового геля клетками (кл) или супернатантами культуральной жидкости (кж) различных условно-патогенных микроорганизмов в 0,05 М АВNB-буфере

Микроорганизм	Желатин		Сывороточный альбумин		Казеин		Протеин PF <sub>1</sub>		Протеин PF <sub>2</sub>	
	кл.	кж.	кл.	кж.	кл.	кж.	кл.	кж.	кл.	кж.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	+	4+	–	+	+	+	3+	3+	4+	4+
<i>E. coli</i> 25922	+	+	+	+	+	+	+	4+	3+	4+
<i>E. coli</i> K-12	+	+	–	+	+	+	+	3+	3+	4+
<i>Salmonella enteritidis</i>	+	+	–	+	+	+	+	3+	3+	4+
<i>Salmonella typhi</i>	+	+	–	+	+	+	+	+	2+	+
<i>Shigella flexneri</i>	+	+	+	+	+	+	3+	4+	4+	4+
<i>Klebsiella pneumonia</i>	±	±	–	+	+	+	+	+	–	±
<i>Serratia marcescens</i>	4+	4+	+	+	+	+	+	3+	3+	4+
<i>Proteus vulgaris</i>	+	+	–	+	+	+	+	+	3+	3+
<i>Proteus mirabilis</i>	+	+	+	+	+	+	+	3+	3+	4+
<i>Staphyl. aureus</i> 25923	±	+	–	+	+	+	–	+	3+	4+
<i>Staphyl. aureus</i> госпитальный штамм	+	+	–	+	+	+	+	+	4+	+

При использовании в качестве субстрата родственного белка — PF<sub>1</sub> выраженное расщепление проявлялось лишь в случае клеток *Pseudomonas aeruginosa* и *Shigella flexneri*, однако этот субстрат расщепляли супернатанты культуральных жидкостей семи штаммов из 12 (табл. 8). Этот момент представляется важным поскольку определение протеолитической активности внеклеточных протеиназ патогенных микроорганизмов, выращиваемых на питательных средах сложного состава (на основе гидролизатов и экстрактов белкового сырья животного и растительного происхождения, сыворотки крови и т.п.), довольно часто бывает затруднено вследствие ингибирующих протеиназы субстанций питательных сред и таковых субстанций, синтезируемых микроорганизмами [10, 11].

**Заключение.** Изложенные материалы, прежде всего, еще раз иллюстрируют сложность выявления протеолитической активности условно-патогенных микроорганизмов. Этот момент обусловлен тем, что часто совершенно неясно, с протеиназами какого характера и какой специфичности придется иметь дело в каждом конкретном случае. Изложенные факты также свидетельствуют в пользу правомерности ранее сделанного нами заключения о необходимости одновременного использования для оценки протеолитической активности патогенных микроорганизмов нескольких различных белков-субстратов [12]. Они также демонстрируют проявления так называемого «фосфатного эффекта» в протеолизе, представления о котором были развиты нами в предыдущих публикациях [например, 6].

Нет сомнения, что, варьируя концентрацию ингредиентов реакционной системы, можно существенно улучшить результаты, приведенные нами выше. Для этого необходимо проведение достаточно объемных специальных систематических исследований. Однако и в рассматриваемом варианте, на наш взгляд, достаточно убедительно показана возможность выявления активности протеиназ практически во всех случаях, не взирая на существенные видовые и штаммовые различия микроорганизмов в структуре

клетки, организации метаболизма, арсенале внеклеточных и внутриклеточных протеиназ, механизмах регуляции их биосинтеза, их активации и постпроцессинговой регуляции.

Авторы выражают благодарность Т.С.Ермаковой и Н.Л.Шатило за помощь в проведении настоящих исследований.

#### Литература

1. Никандров, В.Н. Реализация и регуляция протеолитических процессов на молекулярном и клеточном уровне / В.Н. Никандров, Н.С. Пыжова // *Здравоохранение*. – 2006. – № 11. – С. 4–9.
2. Определитель бактерий Берджи. – М., 1997. – Т. 1 и 2.
3. Белки, ферменты и стерилы базидиальных грибов (Методы исследования). – Л., 1979. – 72 с.
4. Каверзнева, Е.Д. Стандартный метод определения протеолитической активности для комплексных препаратов протеаз / Е.Д. Каверзнева // *Прикл. биох. микроб.* – 1971. – Т. 7, № 2. – С. 225–228.
5. Билай, Т.И. Термофильные грибы и их ферментативные свойства / Т.И. Билай. – Киев, 1985. – 172 с.
6. Пыжова, Н.С. Влияние биогенных фосфатов на расщепление белков протеиназами и функцию активаторов плазминогена / Н.С. Пыжова, В.Н. Никандров // *Биорг. химия*. – 2008. – Т. 34, № 3. – С. 382–391.
7. Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding / M.M. Bradford // *Anal. Biochem.* – 1976. – Vol. 72. – P. 248–254.
8. Ерохина, Л.И. Щелочные протеиназы рода *Bacillus* / Л.И. Ерохина, Е.О. Добржанская // *Биосинтез микроорганизмами нуклеаз и протеаз*. – М., 1979. – С. 244–279.
9. Пыжова, Н.С. Особенности активации лизиса желатина протеиназами в присутствии солей неорганического ортофосфата / Н.С. Пыжова, В.Н. Никандров // *Достижения мед. науки Беларуси: рец. науч.-практ. ежегодник*. – Минск: ГУ РНМБ, 2007. – Вып. 12. – С. 25–26.
10. Выделение эффекторов протеиназ из культуральной жидкости *Corynebacterium diphtheriae* PW-8 / В.Н. Никандров [и др.] // *Проблемы инфекционной патологии XXI века: материалы юбил. конф., посвящ. 80-летию НИИЭМ*. – Минск, 2004. – С. 177–191.
11. Никандров, В.Н. Молекулярные основы патогенности госпитальных штаммов *Pseudomonas aeruginosa*: новые функциональные свойства сине-зеленых пигментов / В.Н. Никандров, Н.С. Пыжова, А.Э. Пыж // *Совершенствование осуществления государственного санитарного надзора в Республике Беларусь: материалы XI съезда гигиенистов и эпидемиологов Республики Беларусь*. – Минск, 2007. – С. 205–211.
12. Никандров, В.Н. Протеолитическая активность клеток *Corynebacterium diphtheriae*: внутриклеточные протеиназы / В.Н. Никандров, Н.С. Пыжова, Н.Л. Шатило // *Современное состояние и перспективы развития микробиологии и биотехнологии: материалы междунар. конф.* – Минск, 2004. – С. 100–102.

## FEATURES OF REVEALING OF PROTEOLYTIC ACTIVITY OF PROVISIONAL-PATHOGENIC MICROORGANISMS' STRAINS

N. S. Pyzhova, V. N. Nikandrov

*Research Institute of Epidemiology and Microbiology,  
Institute of Physiology of NAS of Belarus ([nikandrov@fizio.bas-net.by](mailto:nikandrov@fizio.bas-net.by)), Minsk, Belarus*

Conditions of manifestation of proteolytic activity by 12 hospital strains of microorganisms were studied with the use of some proteins-substrates, solvents and effectors. Complexity of the problem and dependence of analysis result on concrete reaction conditions were demonstrated. The optimal conditions for determination of proteolytic activity of the microorganisms were found.