

14. Shank A. E., Kolter R. New developments in microbial interspecies signaling. *Curr. Opin. Microbiol.* 2009, 12 (2): 205-214.
15. Wenren L.M., Sullivan N.L., Cardarelli L. et al. Two independent pathways for self-recognition in proteus mirabilis are linked by type VI-dependent export. *mBio.* 2013, 4 (4): e00374-13. doi:10.1128/mBio.00374-13.

Поступила 12.03.16

Контактная информация: Бухарин Олег Валерьевич, д.м.н., проф.,
460000, Оренбург, ул. Пионерская, 11, р.т. (3532)77-54-17

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2016

С.Б.Чекнёв, Е.И.Вострова, М.А.Сарычева, А.В.Востров

ТОРМОЖЕНИЕ РОСТА БАКТЕРИЙ В КУЛЬТУРАХ STAPHYLOCOCCUS AUREUS И PSEUDOMONAS AERUGINOSA КАТИОНАМИ МЕДИ И ЦИНКА, ПРИМЕНЕННЫМИ В ФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ КОНЦЕНТРАЦИЯХ

Федеральный научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф.Гамалеи, Москва

Цель. Оценка антибактериального действия связанных белками γ -глобулиновой фракции и свободных катионов меди и цинка, примененных в культурах *S.aureus* и *P.aeruginosa* в физиологических (микромольных) концентрациях. *Материалы и методы.* Суточную культуру бактерий *S.aureus* или *P.aeruginosa* переводили с агара в физиологический раствор и готовили суспензию клеток, содержащую ориентировочно $10^3 - 10^4$ КОЕ/мл. В суспензию вносили образцы металлокомплексов γ -глобулина с катионами меди или цинка (белка 30 или 45 мкг/мл), контрольные γ -глобулины (30 или 45 мкг/мл) и солевые растворы меди или цинка, содержание катионов в которых соответствовало количеству металла, связавшегося с белком на этапе получения металлокомплексов (75 нг/мл). Суспензии инкубировали при 37°C в течение 6 час, через каждые 2 час производя отбор проб и подсчет КОЕ в соответствии с принятым микрометодом. По окончании инкубации (6 ч наблюдения) суспензии переводили в питательный бульон, термостатировали в течение суток при 37°C, после чего оценивали прозрачность питательного бульона в сравнении с контрольным (стерильным). *Результаты.* Начиная с 3 часа наблюдения в культуре *S.aureus* обнаруживается токсическое действие катионов цинка и меди. Жизнеспособные бактерии отсутствуют в культуре с цинком спустя 6 час, с медью — спустя 4 час инкубации. Связавший катионы меди γ -глобулин на сроках 4 и 6 час инкубации на 11,9 — 33,0% ($p < 0,05 - 0,1$) снижает количество жизнеспособных клеток в сравнении с контрольным белком. В культуре *P.aeruginosa* токсическое действие катионов меди проявляется сразу же после инициации культуры и приводит к реализации полного бактерицидного эффекта спустя 4 час наблюдения. Катионы цинка подобными свойствами не обладают. Связавший катионы меди γ -глобулин на сроках 4 и 6 час инкубации на 19,3 — 25,8% ($p < 0,001$) снижает количество жизнеспособных клеток в сравнении с контрольным белком. *Заключение.* Поддерживаемые в физиологическом растворе бактерии *S.aureus* подвержены токсическому действию физиологических (микромольных) концентраций свободных катионов меди и цинка, а также катионов меди, связанных человеческим сывороточным γ -глобулином. В тех же условиях бактерии *P.aeruginosa* испытывают токсическое воздействие катионов меди (но не цинка) как свободных, так и связанных человеческим сывороточным γ -глобулином. При этом в присутствии свободных катионов меди в культурах *S.aureus* и *P.aeruginosa* реализуется полный бактерицидный эффект.

Журн. микробиол., 2016, № 3, С. 9—18

Ключевые слова: антибактериальное действие, медь, цинк, *S.aureus*, *P.aeruginosa*

INHIBITION OF GROWTH OF BACTERIA IN *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* AND *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* CULTURES BY COPPER AND ZINC CATIONS, APPLIED AT PHYSIOLOGICAL CONCENTRATIONS

Gamaleya Federal Research Centre of Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia

Aim. Evaluation of antibacterial effect of γ -globulin fraction bound and free copper and zinc cations, applied in cultures of *S. aureus* and *P. aeruginosa* at physiological (micromolar) concentrations. **Materials and methods.** Day cultures of *S. aureus* or *P. aeruginosa* were transferred from agar to physiological solution, and cell suspension was prepared, containing approximately $10^3 - 10^4$ CFU/ml. Samples of metal-complexes of γ -globulin with copper and zinc cations (30 and 45 $\mu\text{g/ml}$), control γ -globulins (30 and 45 $\mu\text{g/ml}$) and salt solutions of copper and zinc, cation content in those corresponded to the quantity of the metal, that had bound with the protein at the stage of metal-complex obtaining (75 ng/ml), were introduced into the suspension. The suspensions were incubated at 37°C for 6 hours, sampling and CFU count according to the accepted micromethod was carried out every 2 hours. By the end of incubation (6 hours of observation) the suspensions were transferred into nutrient broth, thermostated for 1 day at 37°C, transparency of the nutrient broth compared with control (sterile) was evaluated afterwards. **Results.** Toxic effect of copper and zinc cations is detected starting from the 3rd hour of observation in *S. aureus* culture. Viable bacteria are absent in the culture with zinc after 6 hours, with copper — after 4 hours of incubation. γ -globulin, that had bound copper cations, reduces the quantity of viable cells compared with control protein by 11.9 — 33.0% ($p < 0.05 - 0.1$) at 4 and 6 hours of incubation. In *P. aeruginosa* culture, toxic effect of copper cations manifests immediately after initiation of the culture and results in realization of complete bactericidal effect after 4 hours of observation. Zinc cations do not have such properties. γ -globulin, that had bound copper cations, reduces the quantity of viable cells compared with control protein at 4 and 6 hours of incubation by 19.3 — 25.8% ($p < 0.001$). **Conclusion.** *S. aureus* bacteria, supported in physiological solution are subject to toxic effect of physiological (micromolar) concentrations of free copper and zinc cations, and also copper cations, bound by human serum γ -globulin. *P. aeruginosa* bacteria under the same conditions experience toxic effect of copper cations (but not zinc), free as well as bound by human serum γ -globulin. Whereas a full bactericidal effect is realized in *S. aureus* and *P. aeruginosa* cultures in the presence of free cations of copper.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2016, No. 3, P. 9—18.

Key words: antibacterial effect, copper, zinc, *S. aureus*, *P. aeruginosa*

ВВЕДЕНИЕ

Одним из факторов вирулентности патогенных бактерий выступает их способность к детоксикации по тяжелым металлам, в частности, меди и цинку [8, 16, 17], которые, в свою очередь, играют существенную роль в защите организма хозяина от бактериальных патогенов [8, 23, 24]. В реализации токсического действия катионы меди и цинка могут замещать атомы других металлов в каталитических центрах бактериальных белков [8], ингибировать включение бактериальной клеткой необходимых для обеспечения ее жизнедеятельности микроэлементов [19], опосредовать прямое бактериостатическое или бактерицидное действие [5, 24].

Работами последнего времени, включая результаты наших недавних исследований, обоснованы представления о ранее не известных механизмах преодоления толерантности бактерий к тяжелым металлам [5, 9, 13, 18, 21]. Эти механизмы связаны со стабилизацией цинком исходно недоступных металлу сайтов присоединения меди, в результате чего структуры бактериальной стенки могут подвергаться дестабилизирующему воздействию редокс-активных катионов [5, 18, 21]. Эти механизмы связаны также с вызываемым цинком агрегированием поверх-

ностных бактериальных белков, следствием чего оказывается снижение их функциональной пластичности, активности трансмембранного обмена, способности бактерий к формированию биопленок и обретению всего уровня и степени защиты, которые формируются в условиях бактериального сообщества [5, 9, 13].

Понятно, что в контексте торможения образования биопленки речь может идти только об инициальных стадиях инфекционного процесса — когда биопленка еще не сформировала своего функционального потенциала, не оформилась морфологически и метаболически. По существу, это условия нормального тканевого обмена, не индуцированных межклеточных взаимодействий. Это условия, когда содержание связанного белками и свободного металла в тканях и циркуляции соответствует биохимической норме, а концентрации катионов находятся в пределах физиологических.

Физиологические концентрации меди и цинка в плазме крови человека определяются на уровне 10 — 20 мкМ [14, 20]. При этом медь находится в циркуляции и в тканях в практически полностью связанном белками (преимущественно, церулоплазмином) состоянии, тогда как цинк биологически доступен и в свободной (ионной) форме, содержание которой оценивают в пределах от 0,2 до 1,0 нМ [7, 14]. Металл может дополнительно поступать в кровоток или в периклеточный матрикс тканей за счет активной дегрануляции тромбоцитов и нейтрофилов, когда его локальная концентрация возрастает в 30 — 60 раз [7]. Любое тканевое повреждение или воспаление вызывает высвобождение из тромбоцитарных и нейтрофильных депо значительного количества биологически доступного (лабильного) цинка [7, 20].

В наших исследованиях культуры бактерий *S.aureus* и *P.aeruginosa* проявляли чувствительность к бактериостатическому действию катионов цинка и бактерицидному — меди, примененных в миллимолярных концентрациях [5]; а рост *S.aureus* обнаруживал тенденцию к торможению в присутствии 15 нМ меди и 40 нМ цинка [4], т.е. концентраций катионов, почти на три порядка меньших, чем физиологические. При этом, в отличие от меди, активной в свободном (ионном) состоянии [4], эффект катионов цинка в большей степени характеризовал действие металла, связанного белками γ -глобулиновой фракции [4].

Целью работы явилась оценка антибактериального действия связанных белками γ -глобулиновой фракции и свободных катионов меди и цинка, примененных в культурах *S.aureus* и *P.aeruginosa* в физиологических (микромольных) концентрациях.

Реализация эффекта столь низких концентраций катионов металлов в питательных средах, принятых для культивирования бактерий, сопряжена с известными трудностями, определяемыми возможностью хелатирования катионов присутствующими в объеме белками, гликопротеинами, аминокислотами, сахарами, активно и неспецифически связывающими металл. Поэтому в работе применена технология перевода бактерий из питательной среды в физиологический раствор и постановки опытов в физиологическом растворе. Это предполагало проведение на препаративном этапе исследования сравнительной оценки устойчивости выделенных клинических изолятов к термостатированию в минимальной по основным питательным компонентам среде.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Первичные культуры бактерий *S.aureus* и *P.aeruginosa* получены принятым методом посева патологического биоматериала человека на элективные и селективные питательные среды [1]. В работе использовали один клинический изолят *S.aureus* и один *P.aeruginosa*, отобранные в ходе предварительных исследований из трех изолятов *S.aureus* и трех изолятов *P.aeruginosa* в качестве наиболее устойчивых к термостатированию в течение 24 час при 37°C в физиологическом растворе — снижение динамики роста бактерий не более чем на 1 lg (КОЕ/мл).

Для построения кривых роста (выживания) бактерий из суточной культуры

S.aureus или *P.aeruginosa*, выращенной на чашках Петри с питательным агаром Nutrient Agar (HiMedia Lab.), с использованием стандарта мутности и серии последовательных десятикратных разведений в физиологическом растворе (рН 5,3 — 5,6) готовили суспензию, содержащую ориентировочно 10^3 — 10^4 КОЕ/мл. В полученную суспензию вносили образцы металлокомплексов γ -глобулина с медью или цинком и контрольные белки (конечная концентрация 30 или 45 мкг/мл), а также солевые растворы меди (водный сульфат) (Mec) или цинка (хлорид), содержание металлов в которых соответствовало их количеству, связавшемуся с белком на стадии получения экспериментальных образцов (75 нг/мл в 0,15 M NaCl), или контрольный 0,15 M NaCl.

Суспензии бактериальных клеток в объеме 1,5 мл инкубировали при 37°C в течение 6 час. Отбор проб и подсчет числа КОЕ в культуре проводили на 0, 2, 4 и 6 час инкубации в соответствии с принятым микрометодом.

Для установления вклада бактерицидного компонента в действие свободных и связанных белком катионов металлов по окончании срока наблюдения (6 час) в исследуемые пробы объемом 0,5 мл вносили по 4,5 мл питательного бульона Nutrient Broth (HiMedia Lab.). Образцы термостатировали в течение суток при 37°C, после чего оценивали прозрачность питательного бульона в сравнении с контрольным (стерильным).

При математической обработке результатов исследования достоверность различия средних величин устанавливали с помощью *t*-критерия Стьюдента.

Для получения белковых металлокомплексов использовали препарат человеческого сывороточного γ -глобулина (ICN) в 0,15 M растворе NaCl (рН 6,92 — 6,93) с концентрацией белка по навеске 100 мкг/мл. Освобожденные от крупных ассоциатов мембранной фильтрацией (0,45 мкм, Millipore) образцы γ -глобулина инкубировали в течение 1 час при 37°C с водным сульфатом меди (Mec) или хлоридом цинка; концентрация металла — 0,5 мкг/мл. В качестве контроля использовали образцы γ -глобулина, инкубированные в тех же условиях, но без солей указанных металлов.

По истечении срока инкубации опытные и контрольные образцы в объеме 10 мл подвергали двукратной молекулярной ультрафильтрации в ячейках Ultracel-30k (Millipore) в режиме 1700 g 5 мин с умеренным охлаждением. По окончании фракционирования супернатанты поднимали из ячеек, восстанавливали в 0,15 M растворе NaCl и (как и на всех этапах исследования) анализировали спектрофотометрически в ультрафиолете, в диапазоне длин волн от 190 до 320 нм с шагом 0,1 нм, в автоматическом режиме с использованием дифференцирующего спектрофотометра UV-1800 Shimadzu.

Содержание свободных (не связавшихся с белком) металлов в фильтрате оценивали с использованием фотометрии реакций комплексообразования: меди — с диэтилдитиокарбаматом натрия (рН 9,0 — 9,2), длина волны 440 нм; цинка — с о-фенантролином (нейтральный рН), длина волны 226 нм (UV-1800 Shimadzu). Далее проводили расчет концентрации металлов, связавшихся с белком.

Расчет показателей изменения оптической плотности и молярных отношений в растворе осуществляли на основании концентрации γ -глобулина, установленной спектрофотометрически при длине волны 280 нм (коэффициент экстинкции 0,7). Полученные и использованные в работе образцы γ -глобулина содержали по шесть катионов меди или цинка на молекулу белка.

Кислотность образцов контролировали с помощью базового электронного рН-метра Sartorius PB-11, укомплектованного электродом PY-P11.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Как видно на рис. 1 (А, Б), в физиологическом растворе, дополненном 30 или 45 мкг/мл человеческого сывороточного γ -глобулина (линия 1), роста бактерий в культуре *S.aureus* не наблюдается, количество жизнеспособных клеток в культуре проявляет тенденцию к некоторому монотонному снижению, составляющему на

крайнем сроке наблюдения (6 час) в ед. логарифма КОЕ/мл 14,8 — 24,8% от показателя на старте исследования.

Начиная с третьего часа наблюдения в культуре *S.aureus* обнаруживается токсическое действие катионов цинка (А, линия 3) и меди (Б, линия 3), примененных в дозе 75 нг/мл. В присутствии катионов цинка жизнеспособные бактерии отсутствуют в культуре спустя 6 час наблюдения (рис. 1, А), в присутствии катионов меди жизнеспособных бактерий не определяется на сроке 4 час после инициации культуры (рис. 1, Б).

Белок, связавший 75 нг/мл катионов цинка (А, линия 2), достоверно не отличается в культуре бактерий *S.aureus* от контрольного γ -глобулина. Белок, связавший 75 нг/мл катионов меди (Б, линия 2), на сроках 4 и 6 час после инициации культуры достоверно снижает количество жизнеспособных клеток в сравнении с контрольным γ -глобулином. Выраженная в ед. логарифма КОЕ/мл разница с контрольным белком составляет 11,9% ($p < 0,05$) и 33% ($p < 0,1$) на сроках 4 и 6 час, соответственно.

Очевидно, что поддерживаемые в физиологическом растворе бактерии *S.aureus* подвержены токсическому действию физиологических концентраций катионов меди и цинка, а также катионов меди, связанных человеческим сывороточным γ -глобулином. При этом в присутствии свободных катионов меди и цинка в культуре достигается полный бактерицидный эффект, который в условиях применения катионов меди реализуется на 2 час раньше, чем в присутствии катионов цинка (рис. 1, А и Б).

Как видно на рис. 2 (А, Б), в физиологическом растворе, дополненном 30 или 45 мкг/мл человеческого сывороточного γ -глобулина (линия 1), в культуре *P.aeruginosa* отмечается некоторый рост числа жизнеспособных клеток (А) или их количество практически не меняется на всем сроке наблюдения — до 6 час после инициации культуры (Б).

Сразу же после внесения 75 нг/мл катионов меди в культуру *P.aeruginosa* проявляется их токсическое действие на клетки бактерий, приводящее на сроке 4 час наблюдения к реализации полного бактерицидного эффекта (Б, линия 3). Катионы

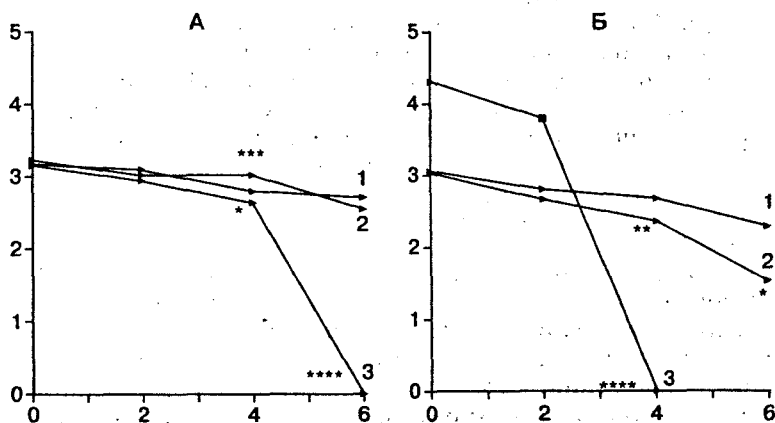


Рис. 1. Торможение роста культуры *S.aureus* в присутствии металлокомплексов человеческого сывороточного γ -глобулина, образованных с катионами цинка (А) и меди (Б) в сравнении с эффектом контрольных белков и катионов металлов, примененных изолированно, $n=6$.

* $p < 0,1$ и ** $p < 0,05$ по сравнению с контрольным белком (1), *** $p < 0,02$ по сравнению с катионами цинка (3), **** $p < 0,001$ по сравнению с контрольным белком (1) и модифицированным катионами металлов γ -глобулином (2). Здесь и на рис. 2: по оси абсцисс — время инкубации (час), по оси ординат — $\lg(\text{КОЕ/мл})$. 1 (А и Б) — контрольные γ -глобулины, 2 (А) — модифицированный цинком γ -глобулин, 2 (Б) — модифицированный медью γ -глобулин, 3 (А) — катионы цинка, 3 (Б) — катионы меди; точка с ординатой 0 приведена на сроке, когда в культуре отсутствуют жизнеспособные бактерии (подтверждено оценкой стерильности питательного бульона).

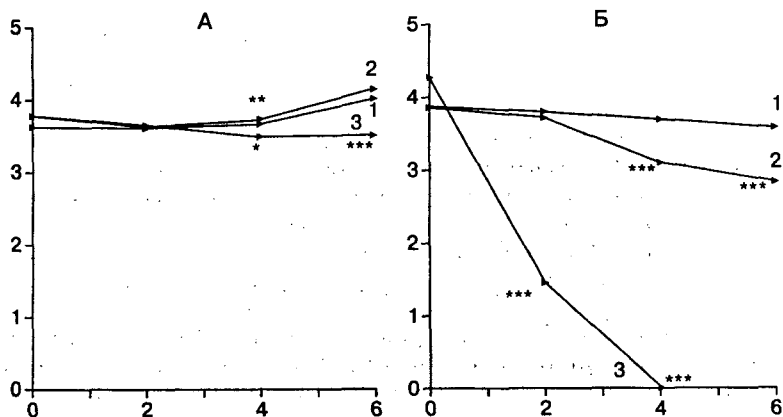


Рис. 2. Торможение роста культуры *P.aeruginosa* в присутствии металлокомплексов человеческого сывороточного γ -глобулина, образованных с катионами цинка (А) и меди (Б) в сравнении с эффектом контрольных белков и катионов металлов, примененных изолированно, $n=6$ или $n=9$.

* $p < 0,02$ по сравнению с контрольным белком (1), ** $p < 0,001$ по сравнению с катионами цинка (3), *** $p < 0,001$ по сравнению с контрольным белком (1) и модифицированным катионами металлов γ -глобулином (2) — А и Б или по сравнению с контрольным белком (1) — Б.

цинка, примененные в дозе 75 нг/мл, подобным действием в отношении клеток *P.aeruginosa* не обладают (А, линия 3). Они, скорее, реализуют бактериостатическое действие, поскольку в сравнении с чистым физиологическим раствором снижают число жизнеспособных клеток в культуре *P.aeruginosa* на 9,4% ($p < 0,001$).

Белок, связавший 75 нг/мл катионов цинка (А, линия 2), достоверно не отличается в культуре бактерий *P.aeruginosa* от контрольного γ -глобулина. Белок, связавший 75 нг/мл катионов меди (Б, линия 2), на сроках 4 и 6 час после инициации культуры достоверно снижает количество жизнеспособных бактерий в сравнении с контрольным γ -глобулином. Выраженная в ед. логарифма КОЕ/мл разница с контрольным белком составляет 19,3% ($p < 0,001$) и 25,8% ($p < 0,001$) на сроках 4 и 6 час наблюдения, соответственно.

Следовательно, поддерживаемые в физиологическом растворе бактерии *P.aeruginosa* подвержены токсическому действию физиологических концентраций катионов меди, а также катионов меди, связанных человеческим сывороточным γ -глобулином. В отличие от свободных катионов цинка и катионов меди, связанных белками γ -глобулиновой фракции, свободные катионы меди реализуют в отношении *P.aeruginosa* очевидное бактерицидное действие (рис. 2 А, Б).

ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты исследования получены в культурах бактерий, поддерживавшихся в ходе постановки экспериментов в физиологическом растворе, дополненном физиологическими (микромольными) концентрациями катионов меди и цинка, примененных в виде водного сульфата и хлорида, соответственно, человеческим сывороточным γ -глобулином и его металлокомплексами, образованными белком, связавшим физиологические (микромольные) концентрации катионов меди или цинка.

Как и в наших предшествующих исследованиях, выполненных на модели «капли на газоне» [5], катионы цинка реализуют выраженное токсическое действие на клетки *S.aureus* и не обладают подобными свойствами в отношении бактерий *P.aeruginosa*. В связанном белками γ -глобулиновой фракции состоянии катионов цинка эффект их воздействия в культуре *S.aureus* утрачивается, а для клеток *P.aeruginosa* металлокомплекс γ -глобулина с цинком, скорее, выступает питательным субстратом, необходимым для жизнеобеспечения бактерий и соответствующим контрольному γ -глобулину.

Диапазон активности катионов меди значительно шире, чем цинка. Как в отношении клеток *S.aureus*, так и в культуре *P.aeruginosa*, они обеспечивают достижение полного бактерицидного эффекта, который в обеих культурах регистрируется на сроке 4 час от старта исследования. При этом показательно, что аналогично экспериментальной модели «капли на газоне» [5] чувствительность *P.aeruginosa* к воздействию катионов меди оказывается заметно выше, чем клеток *S.aureus*, в отношении которых спустя 2 час от старта исследования токсичность металла не определяется. Клетки *P.aeruginosa* в присутствии катионов меди теряют в течение первых 2 час наблюдения почти 75% численности популяции, выраженной в ед. логарифма КОЕ/мл ($p < 0,001$ по сравнению с действием катионов цинка).

В отличие от цинка, будучи хелатированными белками γ -глобулиновой фракции, катионы меди сохраняют способность ингибировать размножение клеток в культурах *S.aureus* и *P.aeruginosa*, достоверно снижать в динамике наблюдения число жизнеспособных бактерий.

В сравнении с широким спектром токсической активности катионов меди, реализуемой в отношении как грамотрицательных (*P.aeruginosa*), так и грамположительных (*S.aureus*) бактерий, действие катионов цинка в значительно большей степени специфично. Известно, что металл определяет функциональную активность многих поверхностных белков и факторов вирулентности патогенных стрептококков [23]. Установлено также, что в концентрациях, не ингибирующих рост *Escherichia coli*, цинк снижает экспрессию факторов вирулентности бактерий и адгезию клеток в культуре [11].

Сказанное позволяет рассматривать эффекты цинка в отношении этих бактерий в качестве патоген-специфических [11, 23] и предполагать, следовательно, реализацию патогенами определенных сигнальных путей, замкнутых на участке, связанных с воздействием или находящихся под контролем катионов цинка, распределенных в межклеточном пространстве.

Действие металла на патогенные стафилококки тоже можно трактовать как патоген-специфическое. Кальпротектин нейтрофилов, хелатируя пищевой цинк, вызывает перепрограммирование бактериального транскриптома и ингибирует рост *S.aureus* [10]. Наоборот, в обогащенных металлом абсцессах отмечают активную пролиферацию бактерий [10].

Белки γ -глобулиновой фракции, хелатирующие катионы металлов из периглобулярного пространства, в силу своих физико-химических и биофизических характеристик выступают переносчиками цинка и меди, пусть даже в локальном окружении [3]. По отношению к бактериям *S.aureus*, экспрессирующим в качестве одного из факторов патогенности поверхностный белок А, служащий Fc рецептором (FcR) клеток [2], γ -глобулины и их металлокомплексы представляются естественными лигандами, сбрасывание которых с рецептора вызывает активацию клетки бактерии [2].

В условиях метаболического стресса, которому подвергаются бактерии, переведенные для поддержания в физиологический раствор, белки γ -глобулиновой фракции и их металлокомплексы, компенсируя недостаточность питательного субстрата, посредством связывания FcR могут поступать в периплазму и цитозоль *S.aureus* и переносить присоединенный ими металл (цинк или медь) внутрь бактериальной клетки.

Но поскольку в биологических системах большая часть цинка (до 70% в плазме крови) непрочно связана с белками (включая γ -глобулины), нет необходимости транспортировать металл в клетку бактерии в связанном белком состоянии [3, 6]. Под действием активируемых контактом клетки с лигандом FcR протеолитических ферментов поверхности цинк может высвобождаться белком в периклеточное (пристеночное) пространство и поступать в клетку напрямую, независимо от трансмембранного перемещения доставившего металл к клетке белка [3, 6]. И хотя у некоторых бактерий, например *E.coli*, репрессия импортера цинка *Zn*C

отмечается при более низких концентрациях металла, чем индукция экспортера ZntA [26], условия метаболического стресса и белкового голодания могут существенно изменять функционирование систем жизнеобеспечения бактерий и способствовать реализации вектора транспорта металла внутрь клетки даже при физиологических, значительно превышающих пороговые по активации импортеров, концентрациях цинка в пристеночном пространстве бактерии [26].

Сказанное в той же степени относится к катионам меди, хотя составляющая 10^{-21} М аффинность наиболее чувствительного к меди сенсора бактерий *E.coli* CueR на несколько порядков превышает таковую цинковых сенсорных белков Zng и ZntR, соответствующую 10^{-15} М [25]. Достаточно сравнить результаты данной работы по меди и цинку, чтобы вынести заключение о высоком сходстве динамики выживания бактерий *S.aureus* в присутствии свободных катионов металлов и накоплении меди, как и цинка, внутри бактериальной клетки. Понятно, что катионы меди и цинка слишком различаются реализуемой редокс-активностью и участием в окислительно-восстановительных процессах, чтобы вызвать форсированную и пролонгированную всего до 2 час гибель бактерий исключительно за счет внешнего воздействия на мембрану.

Показательны данные, полученные в нашей работе в культуре бактерий *P.aeruginosa*, для которых не описано поверхностных структур, соответствующих белку A *S.aureus* и способных связывать белки γ -глобулиновой фракции посредством захвата их Fc региона [2]. Тем не менее, динамика выживания бактерий *S.aureus* и *P.aeruginosa* совпадает по времени реализации полного бактерицидного эффекта свободных катионов меди (4 час от старта исследования) и демонстрирует сходные тенденции в условиях применения связавшего катионы меди γ -глобулина.

Следовательно, в условиях метаболического стресса, сопровождающегося белковым голоданием, подверженные воздействию неблагоприятных факторов бактерии перепрограммируют системы жизнеобеспечения и включают дополнительные механизмы извлечения питательных веществ из внешней среды. Возникает нагрузка клетки металлом, которая не компенсируется активным эффлюксом, поскольку системы детоксикации в названных неблагоприятных условиях тоже будут испытывать недостаток субстратов для обеспечения эффективной работы.

Рассматривая полученные данные в контексте взаимодействия патогена с клетками организма хозяина в ходе развития инфекционного процесса можно полагать, что в реальных условиях инфицирования весьма вероятны и достаточно широко распространены ситуации, при которых бактерии, инфицирующие биологические жидкости и ткани макроорганизма, испытывают воздействие неблагоприятных для них местных или системных изменений гомеостаза в локальном окружении.

Известно, что первичный острофазовый ответ на инфекцию предполагает системное перераспределение цинка (а возможно, и меди) в организме, приводящее к резкому снижению содержания металла в плазме и накоплению его в тканях (прежде всего, печени), где цинк, как и медь, достаточно прочно связывается металлотионеинами [6]. В результате, количество доступного для усвоения бактериями металла существенно снижается, в бактериальных клетках активируется работа транспортеров (у сальмонелл — ZnuABC), позволяющих извлекать цинк из внешней среды, лимитированной по доступности металла [6].

С другой стороны, как отмечено выше, любое тканевое повреждение или воспаление сопровождается активной дегрануляцией тромбоцитов и нейтрофилов, приводящей к высвобождению из внутриклеточных депо значительного количества лабильного (свободного) цинка, в результате чего локальная концентрация металла может возрасти в 30 — 60 раз [7, 20]. И хотя эффективность систем детоксикации бактерий по тяжелым металлам необычайно высока [8, 16, 17], осла-

бленные клетки патогена будут испытывать серьезные проблемы с эффлюксом цинка в условиях многократного повышения его содержания в пристеночном окружении [7, 20].

Не исключено при этом, что активный выброс цинка из клетки может компенсироваться, особенно на фоне формирующейся дисрегуляции транспортных процессов, поступлением в клетку определенного количества меди, известной функциональным антагонизмом цинку и способной даже в физиологических концентрациях реализовать бактерицидное действие, в том числе, на клетки *P. aeruginosa*, считающиеся высокорезистентными к ней [22].

Свидетельства тому, что ослабленные, поддерживаемые в условиях, неблагоприятных для обеспечения жизнедеятельности, бактерии не справляются с активным эффлюксом металла и утрачивают толерантность к его токсическому воздействию, очевидно, представляют результаты опытов на сухих медных поверхностях, в ходе которых вследствие так называемого контактного киллинга численность бактериальных популяций снижалась на 7 — 8 ед. логарифма КОЕ/мл за 1 час, до полного отсутствия нанесенных аэрозолем жизнеспособных бактерий после длительной инкубации [15].

В определенном алгоритме сравнения воздействие сухой меди на клетки бактерий, прежде всего, *S. aureus*, оказывается более эффективным, чем меди, поступающей из раствора [15]. В клетках бактерий, инкубирующихся на сухих медных поверхностях, накапливается больше катионов меди, чем в клетках суспензионной культуры, извлекающих из питательной среды растворенную медь [12]. Уже спустя несколько минут инкубации отмечают повреждение мембраны с последующей утратой целостности бактериальной клетки [12].

Понятно, что системы детоксикации бактерий по тяжелым металлам замкнуты на сохранность и известную степень гидратации поверхностных структур. Дегидратация поверхности клетки резко ограничивает возможности бактерии выводить избыток тяжелых катионов и, наоборот, повышает эффективность реализации механизмов их токсического воздействия [12, 15].

С позиций метаболического стресса, ослабляющего системы детоксикации бактерий по тяжелым металлам и формирующего условия проявления токсического воздействия физиологических концентраций катионов меди и цинка на грамположительные (*S. aureus*) и грамотрицательные (*P. aeruginosa*) бактерии, обоснованно полагать, что в развитии любого инфекционного процесса отдельные этапы взаимодействия патогена с организмом хозяина могут контролироваться физиологическими концентрациями катионов меди и цинка, способными, следовательно, вносить определенный вклад в реализацию механизмов антибактериальной защиты.

ЛИТЕРАТУРА

1. Медицинская микробиология. В.И.Покровский, О.К.Поздеев (ред.). М., ГЭОТАР Медицина, 1998.
2. Тоголян А.А., Бурова Л.А. Fc-рецепторные белки *Streptococcus pyogenes* и патогенез постинфекционных осложнений. Журн. микробиол. 2014, 3: 78-90.
3. Чекнёв С.Б., Бабаева Е.Е., Голуб А.Е., Денисова Е.А., Воробьева У.А. Эффекты меди и цинка при связывании с человеческим сывороточным γ -глобулином. Мед. иммунология. 2006, 8 (5-6): 615-622.
4. Чекнёв С.Б., Вострова Е.И., Писковская Л.С., Востров А.В. Эффекты катионов меди и цинка, связанных белками γ -глобулиновой фракции, в культуре *Staphylococcus aureus*. Журн. микробиол. 2014, 3: 4-9.
5. Чекнёв С.Б., Вострова Е.И., Апрецова М.А., Писковская Л.С., Востров А.В. Торможение роста бактерий в культурах *Staphylococcus aureus* и *Pseudomonas aeruginosa* в присутствии катионов меди и цинка. Журн. микробиол. 2015, 2: 9-17.
6. Ammendola S., Pasquali P., Pistoia C. et al. High-affinity Zn^{2+} uptake system *ZnuABC* is

- required for bacterial zinc homeostasis in intracellular environments and contributes to the virulence of *Salmonella enterica*. *Infect. Immunity*. 2007, 75 (12): 5867-5876.
7. Borza D.-B., Morgan W.T. Histidine-proline-rich glycoprotein as a plasma pH sensor. Modulation of its interaction with glycosaminoglycans by pH and metals. *J. Biol. Chemistry*. 1998, 273 (10): 5493-5499.
 8. Botella H., Stadthagen G., Lugo-Villarino G. et al. Metallobiology of host-pathogen interactions: an intoxicating new insight. *Trends Microbiol.* 2012, 20(3):106-112.
 9. Conrady D.G., Brescia C.C., Horii K. et al. A zinc-dependent adhesion molecule is responsible for intercellular adhesion in staphylococcal biofilms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2008, 105 (49): 19456-19461.
 10. Corbin B.D., Seeley E.H., Raah A. et al. Metal chelation and inhibition of bacterial growth in tissue abscesses. *Science*. 2008, 319 (15): 962-965.
 11. Crane J.K., Naeher T.M., Shulgina I. et al. Effect of zinc in enteropathogenic *Escherichia coli* infection. *Infect. Immunity*. 2007, 75 (12): 5974-5984.
 12. Espirito Santo C., Lam E.W., Elowsky C.G. et al. Bacterial killing by dry metallic copper surfaces. *Appl. Environm. Microbiol.* 2011, 77 (3): 794-802.
 13. Golub E.E., Cheruka J., Boosz B. et al. A comparison of bacterial aggregation induced by saliva, lysozyme, and zinc. *Infect. Immunity*. 1985, 48 (1): 204-210.
 14. Gorgani N.N., Parish C.R., Altin J.G. Differential binding of histidine-rich glycoprotein (HRG) to human IgG subclasses and IgG molecules containing κ and λ light chains. *J. Biol. Chemistry*. 1999, 274 (42): 29633-29640.
 15. Grass G., Rensing C., Solioz M. Metallic copper as an antimicrobial surface. *Appl. Environm. Microbiol.* 2011, 77 (5): 1541-1547.
 16. Hodgkinson V., Petris M.J. Copper homeostasis at the host-pathogen interface. *J. Biol. Chemistry*. 2012, 287 (17): 13549-13555.
 17. Hood M.I., Skaar E.P. Nutritional immunity: transition metals at the pathogen-host interface. *Nature Rev. Microbiol.* 2012, 10: 525-537.
 18. Lu Y. Metal ions as matchmakers for proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2010, 107 (5): 1811-1812.
 19. Remy L., Carrière M., Derré-Bobillot M. et al. The *Staphylococcus aureus* Opp1 ABC transporter imports nickel and cobalt in zinc-depleted conditions and contributes to virulence. *Molec. Microbiol.* 2013, 87 (4): 730-743.
 20. Rink L., Kirchner H. Zinc-altered immune function and cytokine production. *J. Nutrition*. 2000, 130 (5, Suppl.): 1407-1411.
 21. Salgado E.N., Ambroggio X.I., Brodin J.D. et al. Metal templated design of protein interfaces. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2010, 107 (5): 1827-1832.
 22. Samanovic M.I., Ding C., Thiele D.J., Darwin K.H. Copper in microbial pathogenesis: meddling with the metal. *Cell Host Microbe*. 2012, 11: 106-115.
 23. Shafeeq S., Kuipers O.P., Kloosterman T.G. The role of zinc in the interplay between pathogenic streptococci and their hosts. *Molec. Microbiol.* 2013, 88 (6): 1047-1057.
 24. Stafford S.L., Bokil N.J., Achard M.E.S. et al. Metal ions in macrophage antimicrobial pathways: emerging roles for zinc and copper. *Bioscience Reports*. 2013, 33 (4): 541-554.
 25. Waldron K.J., Robinson N.J. How do bacterial cells ensure that metalloproteins get the correct metal? *Nature Rev. Microbiol.* 2009, 7: 25-35.
 26. Yamamoto K., Ishihama A. Transcriptional response of *Escherichia coli* to external zinc. *J. Bacteriol.* 2005, 187 (18): 6333-6340.

Поступила 05.11.15

Контактная информация: Чекнёв Сергей Борисович, д.м.н.,
123098, Москва, ул. Гамалеи, 18, р.т. (499)190-43-88