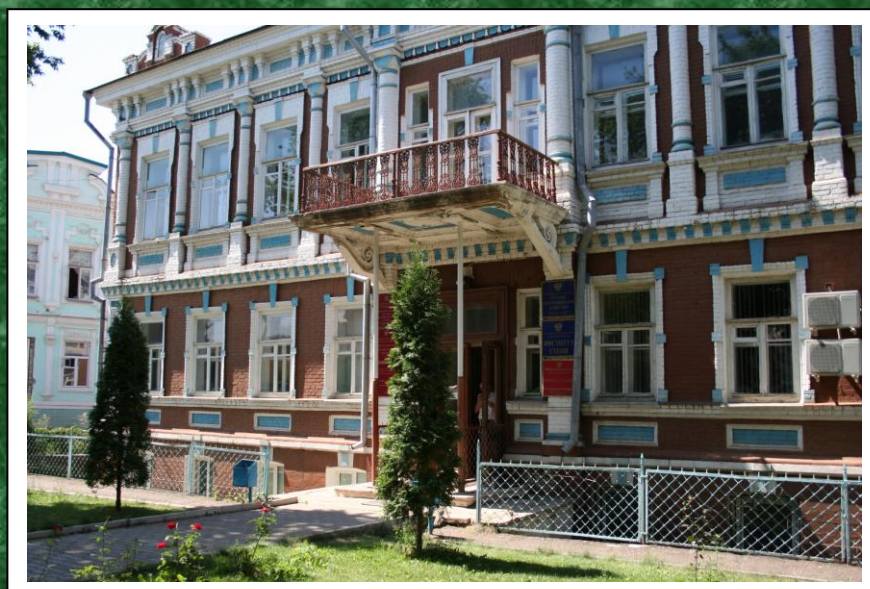


ISSN 2304-9081

Учредители:  
Уральское отделение РАН  
Оренбургский научный центр УрО РАН

**Бюллетень**  
**Оренбургского научного центра**  
**УрО РАН**  
(электронный журнал)



**2012 \* № 3**

On-line версия журнала на сайте  
<http://www.elmag.uran.ru>

© Коллектив авторов, 2012

УДК 579.61

*С.В. Андрющенко<sup>1</sup>, Н.Б. Перунова<sup>1,2</sup>, Е.В. Иванова<sup>1,2</sup>, О.В. Бухарин<sup>1</sup>*

**ДЕЙСТВИЕ СОЕДИНЕНИЙ АКРИДОНОВОГО РЯДА НА УРОВЕНЬ АНТИЛИЗОЦИМНОЙ АКТИВНОСТИ И КОПИЙНОСТЬ ПЛАЗМИДНОЙ ДНК ШТАММА *ESCHERICHIA COLI* 252.**

<sup>1</sup> Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза УрО РАН, Оренбург, Россия

<sup>2</sup> Оренбургская государственная медицинская академия, Оренбург, Россия

В данной работе проведено исследование вариабельности числа копий плазмидной ДНК и антилизоцимной активности при действии акридинового оранжевого и препарата «Циклоферон» в клетках штамма *E. coli* 252 (ИКВС УрО РАН). Полученные данные свидетельствуют в пользу различных механизмов ингибирования антилизоцимного признака бактерий под действием акридоновых соединений.

*Ключевые слова:* акридины, акридоны, Циклоферон, эффект дозы генов, антилизоцимная активность.

*S.V. Andryuschenko<sup>1</sup>, N.B. Perunova<sup>1,2</sup>, E.V. Ivanova<sup>1,2</sup>, O.V. Bukharin<sup>1</sup>*

**EFFECT OF ACRIDINES ON ANTILYSOZIME ACTIVITY LEVEL AND PLASMID DNA COPIES OF *ESCHERICHIA COLI* 252 STRAIN**

<sup>1</sup> Institute of cellular and intracellular symbiosis UrB RAS, Orenburg, Russia

<sup>2</sup> Orenburg state medical academy, Orenburg, Russia

In this study we have investigated changes of a plasmid DNA copies and anti-lysozime activity under influence of acridine orange and a «Cycloferon» in the cells of *E. coli* 252 (ICIS UrB RAS) strain. The obtained data testify in favour of various mechanisms of inhibition of anti-lysozime sign of bacteria under action of acridines.

*Key words:* acridines, acridones, Cycloferon, gene-dose effect, anti-lysozime activity.

**Введение.**

Известно, что хлорамфеникол, стимулируя антилизоцимную активность [5, 2], в то же время оказывает неспецифический амплифицирующий эффект на копиюность плазмид [6, 9]. Для соединений акридинового ряда показано обратное – ингибирующее действие акридонуксусной кислоты в отношении антилизоцимного признака [4], и акридинового оранжевого на число копий плазмидной ДНК в бактериальных клетках [8].

Эти данные, с учетом опубликованных работ [1, 3], служат косвенным доказательством преимущественно плазмидной локализации генетических детерминант антилизоцимного признака у бактерий и его регуляции через механизм дозы генов [7], при условии выраженной корреляции между концентрацией препарата в среде и уровнем исследуемого признака. Данная корреляция была отмечена нами ранее в отношении только стимулирующего эффекта хлорамфеникола, но не изучена в отношении ингибирующего действия акридоновых соединений: акридинового оранжевого и акридонуксусной кислоты. В последнем случае данные о влиянии акридонуксусной кислоты на копияность плазмидной ДНК в литературе отсутствуют, что важно для понимания механизмов действия этого соединения – активного компонента препарата «Циклоферон», – на персистентные свойства микроорганизмов.

В связи с этим целью настоящего исследования явилось определение изменений числа копий плазмидной ДНК и уровня антилизоцимной активности плазмидосодержащего штамма *Escherichia coli* 252 под действием препаратов акридинового оранжевого и акридонуксусной кислоты.

#### **Материалы и методы.**

Моделью для исследования послужил штамм *E. coli* 252 из музейной коллекции лаборатории биомониторинга и молекулярно-генетических исследований ИКВС УрО РАН, выделенный ранее из кишечного биотопа человека, обладающий антилизоцимной активностью (более 1 мкг/мл\*ОП).

У данного штамма было проведено определение биохимического профиля (биовара) с помощью тест-системы «ЭНТЕРО-тест 24» (PLIVA-LaCerna, Чехия), профиля резистентности (резистовара) к 5 стандартно используемым антибиотикам для культивирования плазмидосодержащих штаммов: ампициллина, канамицину, стрептомицину, тетрациклину и хлорамфениколу с определением минимальной подавляющей концентрации (МПК) и установлено наличие двух плазмид величиной 4,3 и 7 т.н.п., получивших название pS252 и pL252 соответственно.

В работе был использован акридиновый оранжевый («Диа-М», ч.д.а., Россия), водный раствор 25 мг/мл, применявшийся в 0,5 и 1-кратной начальной ингибирующей концентрации (37,5 и 75 мкг/мл соответственно) по Т.Т. Томас с соавт. [8] и акридонуксусная кислота в виде препарата «Циклоферон» («Полисан», Россия), раствор для инъекций 125 мг/мл, взятый в конечной концентрации 5 мг/мл LB-бульона, так как антимикробный эффект препарата не был вы-

явлен. С целью повышения чувствительности применяемой методики для амплификации числа копий плазмид и стимуляции антилизоцимной активности применялся хлорамфеникол («Panheas», pharm grade, Испания), раствор 34 мг/мл в этиловом спирте, вносимый в 1-кратной МПК для *E. coli* 252 с учетом инокулюм-эффекта (612 мкг/мл).

Культивирование и инкубация в среде с исследуемыми препаратами проводились по методике неспецифической амплификации плазмидной ДНК по Т. Маниатису с соавт. [6], с изменениями: объемы сред уменьшены на порядок, и время первого культивирования сокращено до 2,5 ч. С целью предварительного нормирования итоговых значений микробного числа, непосредственно перед внесением препаратов производилось добавление стерильного бульона Лурия-Бертани (LB), в объемах, определенных эмпирически в пилотных экспериментах. В качестве контроля использовалась среда LB без добавления исследуемых препаратов.

После завершения инкубации производилась верификация и, при необходимости, заключительное нормирование контрольной и опытных проб бактериальной культуры по плотности с применением абсорбционного спектрофотометра «ELx808-I» (BioTek, США) при 630 нм до концентрации  $0,5 \cdot 10^9$  КОЕ/мл для дальнейших количественных анализов.

Определение числа копий плазмид в клетках исследуемого штамма *E. coli* 252 проводилось путем выделения плазмидной ДНК методом щелочного лизиса клеток из 3 мл культуры с последующей экстракцией пДНК с помощью miniprep комплектов (Axugen, США).

Полученные растворы плазмидной ДНК подвергались электрофорезу в агарозном геле [6]. Электрофорез проводился в TBE-буфере однократной концентрации с 50 мкг/мл этидия бромид в качестве люминесцентного красителя при напряженности поля 5 в/см в течение 1,5 ч. Визуализация результатов электрофоретического разделения нуклеиновых кислот проводилась на установке гель-документирования «Vilber Lourmat» (Франция).

В качестве маркеров молекулярной массы и количества молекул нуклеиновых кислот использовался линейный маркер «1 kb» (ООО «Лаборатория Медиген», Россия) в количестве 0,75 и 1,5 мкг. Оценка наличия или количества молекул плазмидной ДНК осуществлялась путем сравнения интенсивности полос люминесценции контрольных и опытных проб ДНК с использованием про-

граммного обеспечения «TotalLab 2.01» (Nonlinear Dynamics, Ltd, Великобритания).

Определение антилизоцимной активности полученных культур производилось фотометрическим методом по О.В. Бухарину с соавт. [2] после трехкратного промывания бактериальной массы стерильным физиологическим раствором и 2,5-часовой инкубации в исходных количествах стерильного LB-бульона.

### **Результаты.**

Исследование динамики копий плазмид штамма *E. coli* 252 (рис. 1) под воздействием акридинового оранжевого показало снижение копийности плазмидной ДНК от уровня  $96 \pm 2,2$  копий/клетку вплоть до полного отсутствия электрофоретически-визуализируемой плазмидной ДНК при достижении 1-кратной начальной ингибиторной концентрации препарата. Однако исследование получаемых клонов показывало наличие всех имеющихся маркеров антибиотикорезистентности, что свидетельствовало о сохранности плазмид в клетках.

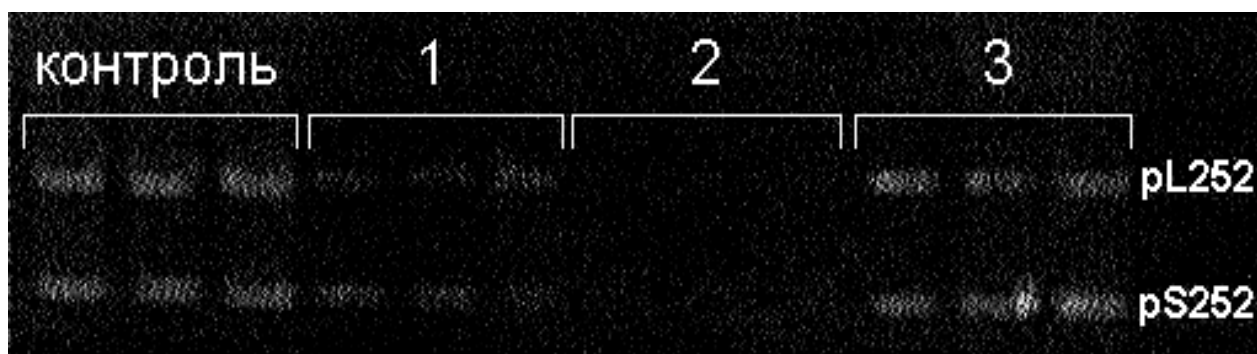


Рис.1. Фореграмма плазмид штамма *E. coli* 252 после инкубации с акридиновым оранжевым и циклофероном.

- 1 – пДНК при инкубации с 37,5 мкг/мл акридинового оранжевого;
- 2 – пДНК при инкубации с 75 мкг/мл акридинового оранжевого;
- 3 – пДНК при инкубации с 5 мг/мл циклоферона.

При внесении в среду «Циклоферона», количество плазмидной ДНК, приходящееся на одну клетку не изменялось.

Изучение динамики антилизоцимной активности исследуемого штамма при действии акридинового оранжевого выявило сходную картину: при повышении концентрации акридинового оранжевого до уровня начальной ингибирующей концентрации происходило уменьшение уровня антилизоцимной активности: с  $1,35 \pm 0,25$  мкг/мл\*ОП до нулевых значений (рис. 2).

Под действием препарата «Циклоферон» также наблюдалось снижение значений антилизоцимного признака вплоть до полного его отсутствия.

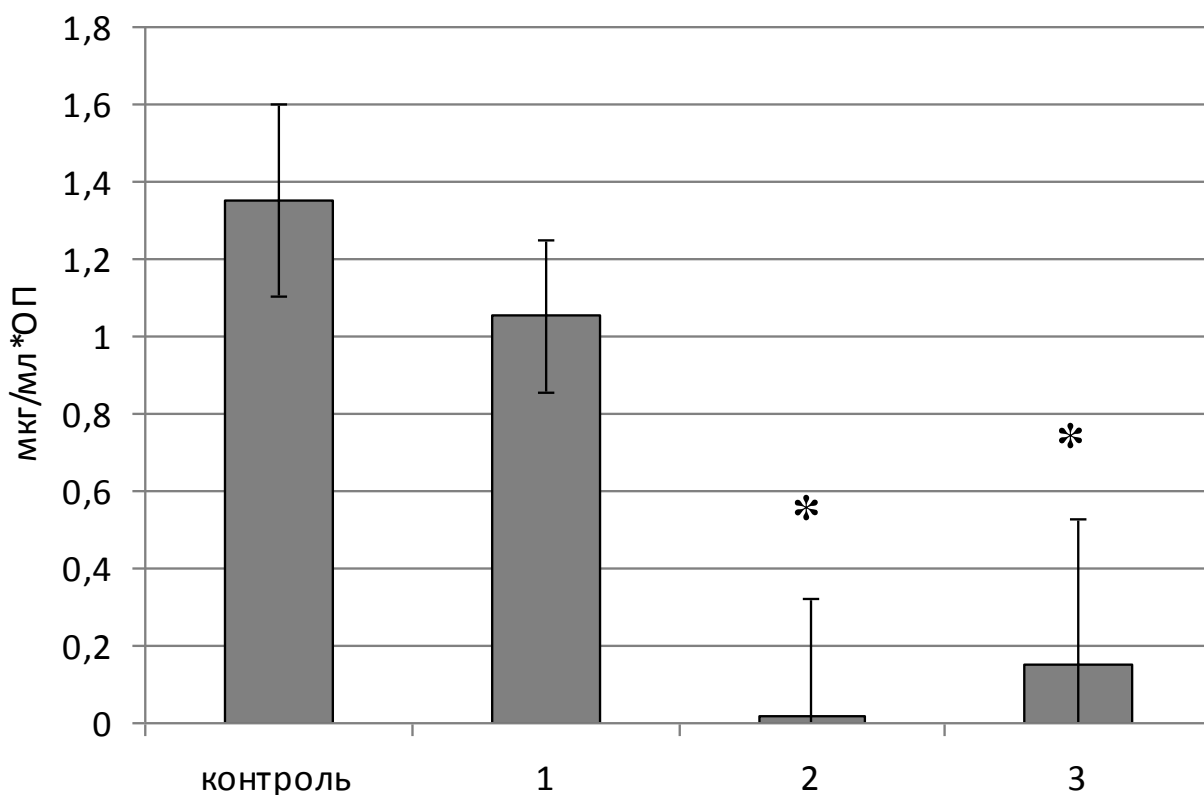


Рис.2. Уровни антилизоцимной активности (АЛА) штамма *E. coli* 252 после инкубации в среде с акридиновым оранжевым и циклофероном.

Обозначения:

1 – уровень АЛА при инкубации с 37,5 мкг/мл акридинового оранжевого; 2 – уровень АЛА при инкубации с 75 мкг/мл акридинового оранжевого; 3 – уровень АЛА при инкубации с 5 мг/мл циклоферона;

по оси ординат – уровень АЛА, мкг/мл\*ОП;

\* - достоверные отличия от контроля ( $p < 0,05$ ).

### Обсуждение.

Ингибирование числа копий плазмидной ДНК и уровня антилизоцимной активности *E. coli* 252 под действием акридинового оранжевого позволяет предположить, что данный фенотипический эффект реализуется за счет эффекта дозы генов, локализованных в плазмиде.

Уменьшение уровня антилизоцимной активности под действием «Циклоферона» при отсутствии влияния его на копийность плазмид показывает, что

механизм регуляции персистентных свойств препаратом «Циклоферон» находится не на генотипическом уровне.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Бондаренко В.М., Петровская В.Г., Яблочков А.Л., Антилизосимный фактор *Klebsiella pneumoniae*: природа, биологические функции и генетический контроль Журн. микробиол., 1994, 1: С.22-8.
2. Бухарин О.В. Персистенция патогенных бактерий. М., Медицина, 1999.
3. Бухарин О.В., Кириллов Д.А., Кириллов В.А. Скрининг плазмид у бактерий рода *Bacillus*, обладающих антилизосимной активностью. Журн. микробиол., 2006, 1: С.3-6.
4. Бухарин О.В., Кириллов Д.А., Шеенков Н.В., Кириллов В.А. Влияние циклоферона на биологические свойства бактериальных внутриклеточных патогенов. Журн. микробиол., 2005, 3: С.8-10
5. Зыкова Л.С. Этиологическая характеристика пиелонефрита и её значение для экспериментально-клинического обоснования антибактериальной терапии. Автореферат дисс. ... канд. мед. наук, Челябинск, 1986.
6. Маниатис Т. Фрич Э. Сэмбрук Дж. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование. М.: Мир., 1984. 480с.
7. Foster T.J. Plasmid-Determined Resistance to Antimicrobial Drugs and Toxic Metal Ions in Bacteria. Microbiological Rev. 1983. V.47 (3): P.361-409
8. Tomas T.J., William W.K. A simple and rapid method for the elimination of R plasmids from enteric bacteria. Current Microbiology. 1984; V.11: P.155-158.
9. Weinberger M. and Helmstetter C. E. Inhibition of protein synthesis transiently stimulates initiation of minichromosome replication in *Escherichia coli* // J Bacteriol. 1989. 171 (7): P.3591–3596.

Поступила 23.09.2012

(Контактная информация: Андриющенко Сергей Валерьевич – научный сотрудник Института клеточного и внутриклеточного симбиоза УрО РАН; адрес: 460000, г. Оренбург, ул. Пионерская, 11, тел. 8 (3532) 775417; e-mail: rattus000@gmail.com)