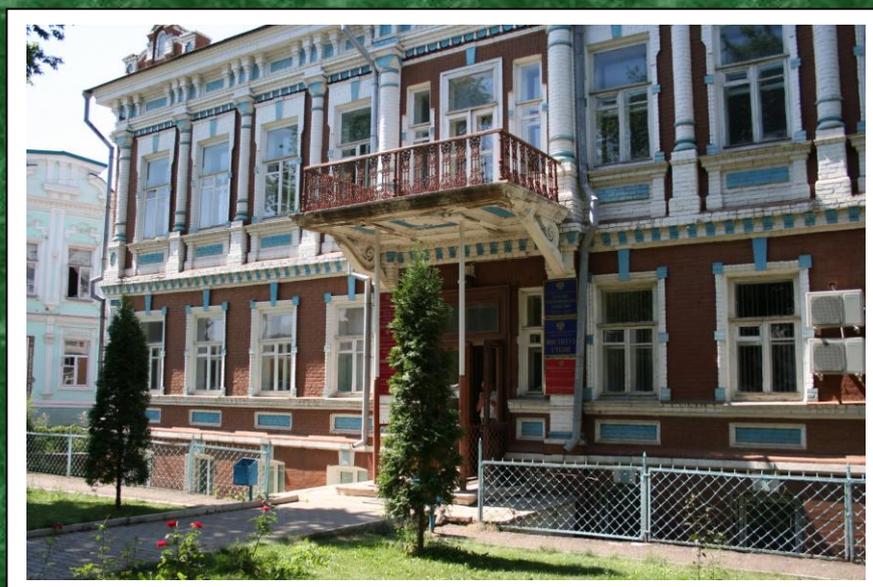


ISSN 2304-9081

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. Андрющенко¹, Н.Б. Перунова^{1,2}, Е.В. Иванова^{1,2}, О.В. Бухарин¹

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

¹ Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза УрО РАН, Оренбург, Россия

² 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. Andryuschenko¹, N.B. Perunova^{1,2}, E.V. Ivanova^{1,2}, O.V. Bukharin¹

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

¹ Institute of cellular and intracellular symbiosis UrB RAS, Orenburg, Russia

² 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-LaCHEMA, 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 антимицробный эффект препарата не был вы-

явлен. С целью повышения чувствительности применяемой методики для амплификации числа копий плазмид и стимуляции антилизозимной 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.

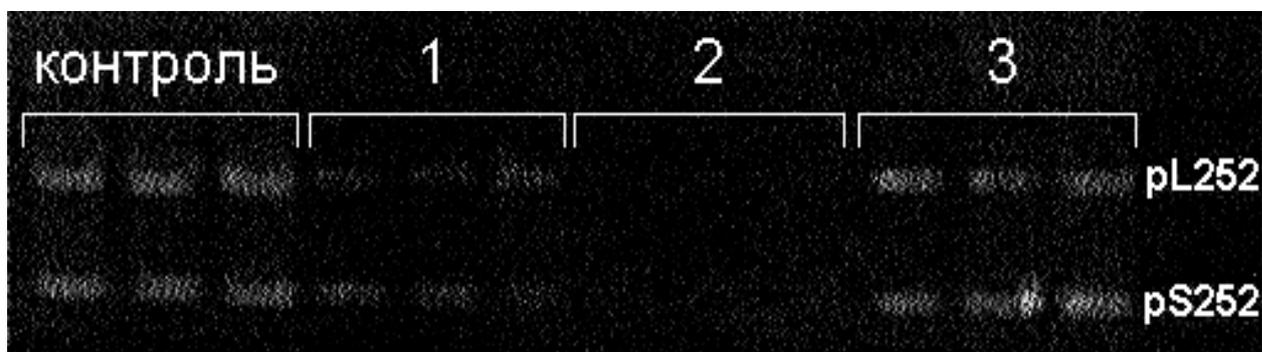


Рис.1. Фореграмма плазмид штамма *E. coli* 252 после инкубации с акридиновым оранжевым и циклофероном.

- 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 антилизозимного признака вплоть до полного его отсутствия.

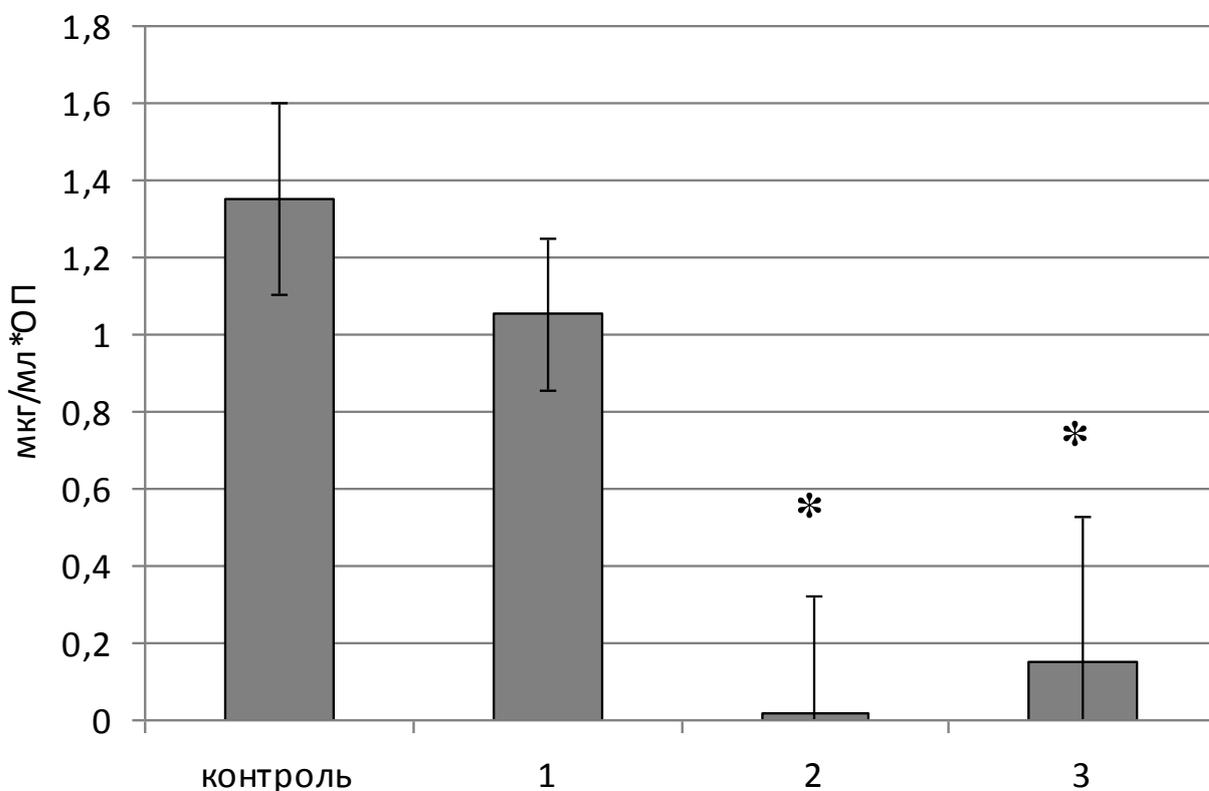


Рис.2. Уровни антилизозимной активности (АЛА) штамма *E. coli* 252 после инкубации в среде с акридиновым оранжевым и циклофероном.

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 антилизозимной 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 антилизозимной 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)