

ми данными, полученными в ходе настоящего исследования, можно объяснить независимый вклад нарушений дыхания во сне в поражение почек при наличии ассоциированной с СОАС АГ. Изменения суточного профиля АД и в частности ДАД, ассоциируются с нарушением функции почек.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. У пациентов с АГ и СОАС имеются более выраженные нарушения суточного профиля АД, достоверно чаще отмечается недостаточное снижение показателей АД ночью.

2. Среди больных АГ и СОАС отмечены статистически значимо более низкие показатели СКФ, большая экскреция альбумина с мочой по сравнению с группой изолированной АГ.

3. С увеличением тяжести СОАС у больных АГ возрастает недостаточное снижение показателей АД, особенно диастолического, в ночное время, частота обнаружения МАУ и снижается фильтрационная функция почек.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Agrawal V., Vanhecke T. E., Rai B., et al. // *Nephron Clin Pract.* — 2009. — Vol. 113. — P. 140—147.
2. Clinical Practice Guideline for the Evaluation and Management of Chronic Kidney Disease. *Kidney International Supplements.* — 2013.
3. Davies C. W. H., Crosby J. H., Mullins R. L., et al. // *Thorax.* — 2000. — Vol. 55. — P. 736—740.
4. Duran J., Esnaola S., Rubio R., et al. // *Am J Respir Crit Care Med.* — 2001. — Vol. 163. — P. 685—689.

5. Endeshaw Y. W., White W. B., Kutner M., et al. // *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* — 2009. — Vol. 64. — P. 280—285.
6. Faulx M. D., Storfer-Isser A., Kirchner H. L., et al. // *Sleep.* — 2007. — Vol. 30. — P. 923—929.
7. Hansen T. W., Thijs L., Li Y., et al. // *Hypertension.* — 2010. — Vol. 55. — P. 1049—1057.
8. Lavie P., Hoffstein V. // *Sleep.* — 2001. — Vol. 24. — P. 721—725.
9. Loreda J. S., Nelesen R., Ancoli-Israel S., et al. // *Sleep.* — 2004. — Vol. 27. — P. 1097—1103.
10. Mello P., Franger M., Boujaoude Z., et al. // *Am J Kidney Dis.* — 2004. — Vol. 44. — P. 636—641.
11. Punjabi N. M., Newman A., Young T., et al. // *Am J Respir Crit Care Med.* — 2008. — Vol. 177 (10) — P. 1150—1155.
12. Ruttanaumpawan P., Nopmaneejumrulers C., Logan A. G., et al. // *J Hypertens.* — 2009. — Vol. 27. — P. 1439—1445.
13. Ting H., Lo H. S., Chang S. Y., et al. // *Sleep Med.* — 2009. — Vol. 10. — P. 720—725.
14. Ursavas A., Karadag M., Gullulu M., et al. // *Sleep Breath.* — 2008. — Vol. 12. — P. 217—222.
15. Verhulst S. L., Van Hoeck K., Schrauwen N., et al. // *Horm Res.* — 2008. — Vol. 70. — P. 224—229.

## Контактная информация

**Стаценко Михаил Евгеньевич** — д. м. н., профессор, зав. кафедрой внутренних болезней педиатрического и стоматологического факультетов, Волгоградский государственный медицинский университет, e-mail: mestatsenko@rambler.ru

## ЦИТОТОКСИЧЕСКОЕ ДЕЙСТВИЕ *BURKHOLDERIA CEPACIA* НА КЛЕТКИ *TETRAHYMENA PYRIFORMIS* ПРИ СОВМЕСТНОМ КУЛЬТИВИРОВАНИИ

**Е. В. Король, Л. К. Меринова, М. О. Нехезина, Е. В. Шубникова**

*Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт*

Показано, что микроорганизмы комплекса *B. cepacia* резистентны к фагоцитирующей активности ресничных инфузорий вида *T. pyriformis* и в сокультуре с ними могут сохраняться длительное время (срок наблюдения 14 сут). Цитотоксическое действие буркхольдерий на клетки тетрахимен проявляется в инцистировании инфузорий. Интенсивность процесса цистообразования находится в зависимости от штамма. При этом наиболее выраженным цистообразующим (цитотоксическим) эффектом обладает штамм *B. ceposercacia* 323, клинический изолят с повышенной вирулентностью для экспериментальных животных.

*Ключевые слова:* *Burkholderia cepacia*, *Tetrahymena pyriformis*.

## CYTOTOXIC EFFECT OF *BURKHOLDERIA CEPACIA* ON *TETRAHYMENA PYRIFORMIS* CELLS IN COMMON CULTURE

**E. V. Korol, L. K. Merinova, M. O. Nekhezina, E. V. Shubnikova**

The conducted research showed that the microorganisms of *B. cepacia* complex are resistant to the phagocytic activity of *T. pyriformis*. The cytotoxic effect of *B. cepacia* against *Tetrahymena* cells is manifested in the fact of protozoan encystment. The intensity of this process depends on bacterial strain. Thus the most pronounced encystment was observed upon interaction with the strain of *B. cepacia* 323, a clinical isolate showing enhanced virulence for experimental animals.

*Key words:* *Burkholderia cepacia*, *Tetrahymena pyriformis*.

Микроорганизмы комплекса *Burkholderia cepacia* известны как оппортунистические патогены человека, вызывающие госпитальные инфекции и заболевания у лиц с иммунодефицитными состояниями [9, 10]. Для изучения факторов патогенности этих микроорганизмов обычно используют экспериментальных животных или культуры клеток [7, 8, 13]. Адекватной моделью для оценки вирулентности *B. cepacia* являются также растения [6].

Показано, что бактерии комплекса *B. cepacia* могут находиться в симбиотических отношениях с некоторыми представителями простейших (амебами — *Acanthamoeba spp.* и ресничными инфузориями — *Tetrahymena pyriformis*), в процессе взаимодействия с которыми формируются адаптационные механизмы, необходимые как для сохранения вида во внешней среде, так и для выживания его в эукариотических клетках [2, 5, 11]. В ассоциации с простейшими буркхольдерии длительно существуют в клетках вегетативной формы и остаются жизнеспособными внутри образующихся цист.

Известно, что образование цист клетками *T. pyriformis* происходит при различных неблагоприятных условиях. Вместе с тем, как установлено в недавней работе *Pushkareva, et al.* (2010), инцистирование этого вида инфузорий может быть результатом цитопатогенного действия микроорганизмов, находящихся в ассоциации с ними, и коррелировать с показателями вирулентности бактерий для экспериментальных животных [13]. В настоящей работе мы исследовали влияние бактерий комплекса *B. cepacia*, культивируемых вместе с *T. pyriformis*, на процесс инцистирования инфузорий.

### ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Определить сохранение жизнеспособности буркхольдерий внутри клеток *T. pyriformis*, сравнить цито-

токсический эффект различных штаммов *B. cepacia* на клетки тетрахимен, а также оценить возможность использования данной модели для дальнейшего изучения бактериальных факторов патогенности.

### МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Аксеническая культура инфузорий *T. pyriformis* получена из Института цитологии РАН (г. Санкт-Петербург). Тетрахимены выращивали в L бульоне «Difco» (США) при температуре 25 °С.

В работе использовали штаммы *B. cepacia* 25416 (типовой штамм); *B. ceposercacia* 323, клинический изолят из крови больного; мутантный штамм *B. cepacia* KM 196, с множественной чувствительностью к антибиотикам, дефектный по белку-порину ОрсР1 из коллекционного центра Волгоградского научно-исследовательского противочумного института, а также *B. ceposercacia* 323С, выделенный из цист *T. pyriformis* при выполнении данной работы. Для изучения динамики изменения численности микроорганизмов в сокультуре с простейшими бактерии предварительно выращивали на L агаре «Difco» в течение 48 ч при температуре 32 °С, культуру суспендировали в минеральной среде Прескотта для получения взвеси, содержащей 1 × 10<sup>6</sup> м.к./мл.

Культуры простейших и микроорганизмов соединяли в количественном соотношении 1:100 (1 × 10<sup>4</sup> к/мл : 1 × 10<sup>6</sup> м.к./мл.) в среде Прескотта и инкубировали при температуре 25 °С от 1, 24 ч до 7, 14 сут. После каждой экспозиции тетрахимены отмывали от внеклеточно расположенных бактерий средой Прескотта путем двукратного центрифугирования в микроцентрифуге «Eppendorf» (1000 об./мин, 10 мин). Далее клетки простейших разрушали с помощью стеклянных бус, выделяя из них внутриклеточные микроорганизмы.

При определении цитотоксичности штаммов клетки простейших соединяли с культурой микроорганизмов в том же соотношении в L бульоне и инкубировали при температуре 28 °С в течение 1—6 сут. Количество трофозоитов и цист подсчитывали ежедневно в камере Горяева, предварительно обеззараживая сокультуру 10%-м формалином.

Морфологические изменения клеток тетрахимен оценивали при световой микроскопии (микроскоп Lomo Micmed 6, увеличение 10 × 90) и визуализировали их на экране компьютера с использованием программы Scope Photo «Hangzhou Scopetek» (Китай).

Для выделения инцистированных бактерий сокультуру в L бульоне после перехода всех трофозоитов в цисты оставляли в холодильнике при температуре 8 °С в течение 3 месяцев. После этого разрушали сохранившиеся цисты методом замораживания-оттаивания и выделяли микроорганизмы на селективной среде для *V. seracía*, содержащей полимиксин и гентамицин [1].

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Исследование взаимодействия микроорганизмов и тетрахимен в сокультуре в среде Прескотта показало, что поглощение буркхольдерий клетками простейших начинается с первых минут контакта. Клетки тетрахимен при этом изменяют форму и внешнюю структуру, что выявляется при световой микроскопии (их цитоплазма становится более темной, в ней появляются пищеварительные вакуоли).

После 1- и 24-часового пребывания в сокультуре количество внеклеточных бактерий, первоначально составлявшее  $1 \times 10^6$  м.к./мл, снижалось по сравнению с исходной концентрацией в среднем на 1,5—2 порядка. Однако в обоих случаях после разрушения клеток простейших наблюдалось увеличение количества микроорганизмов по сравнению с их содержанием в супернатанте, что свидетельствовало о выделении их из разрушенных тетрахимен (рис. 1).

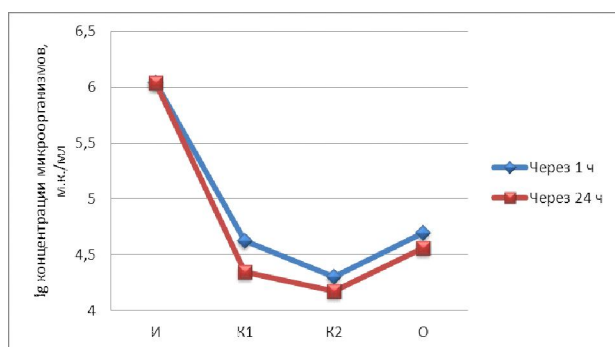


Рис. 1. Динамика изменения концентрации планктонных бактерий *V. seposeracia* 323 в сокультуре с тетрахименами: И — исходная концентрация (м.к./мл), К1, К2 — содержание в надосадочной жидкости после 1—2-кратного центрифугирования соответственно, О — концентрация бактерий после разрушения тетрахимен

Далее, соединив культуры тетрахимен и буркхольдерий в указанном соотношении, мы увеличили время

контакта до 7—14 сут. При этом установили, что после освобождения сокультуры от планктонных бактерий и последующего разрушения тетрахимен также наблюдается увеличение количества выделенных микроорганизмов.

Таким образом, исследование взаимодействия *V. seracía* с клетками тетрахимен в минеральной среде Прескотта показало, что в сокультуре с ними буркхольдерии поглощаются клетками инфузорий в течение первого часа и остаются жизнеспособными внутри них длительное время (7—14 сут.).

Для выявления цитотоксического действия *V. seracía* на тетрахимены мы инкубировали сокультуры также в соотношении клеток 1 : 100 в бульоне при температуре 28 °С. Микроскопическое исследование установило, что клетки простейших через 1 ч содержали большое количество вакуолей, а в более поздние сроки в сокультуре начинали образовываться цисты в виде клеток округлой формы, покрытых утолщенной оболочкой.

Первоначально процесс цистообразования исследовали, используя культуры *V. seracía* 25416 и *V. seposeracia* 323. За сокультурами наблюдали в течение 6 сут. (рис. 2).

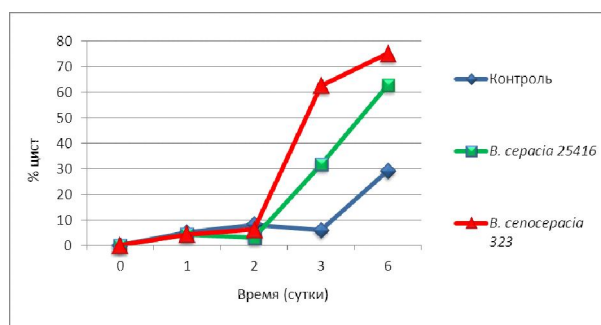


Рис. 2. Отношение количества образовавшихся цист к общему количеству клеток *T. pyriformis* в течение 6 суток совместного инкубирования с буркхольдериями, выраженное в процентах: К — количество цист *T. pyriformis*, спонтанно образующихся в бульоне

Как видно на рис. 2, динамика цистообразования медленно нарастала независимо от штамма в течение 1—2 сут. и приобретала отчетливые различия, вызванные воздействием этих штаммов, через 3—6 сут.

Количественные показатели в соотношении трофозоитов и цист в сокультурах со штаммами 25416 и 323 представлены на рис. 3, который отчетливо демонстрирует более выраженный цитотоксический эффект штамма *V. seposeracia* 323.

Для дальнейшего исследования цитотоксичности дополнительно были взяты штаммы *V. seracía* KM 196 и *V. seposeracia* 323С, выделенной из цист *T. pyriformis*. При определении цитотоксичности этих штаммов было установлено, что штамм *V. seracía* KM 196 занимает промежуточное положение между «контролем» и исходным штаммом *V. seracía* 25416, тогда как *V. seposeracia* 323С явно отличается более выраженной цистообразующей активностью как от двух первых штаммов, так и от *V. seposeracia* 323 (рис. 4—5).

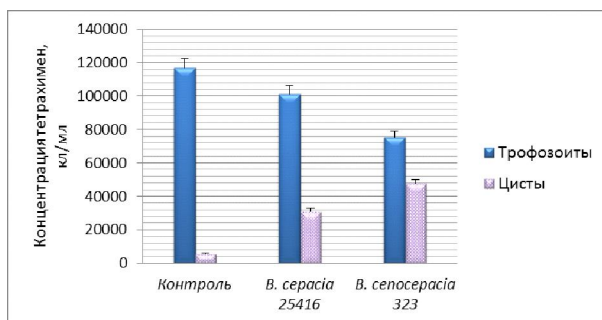


Рис. 3. Соотношение трофозоитов и цист в сокультуре *T. pyriformis* со штаммами *B. seracia* 25416 и *B. senoserasia* 323 через 72 ч после начала контакта,  $p < 0,05$

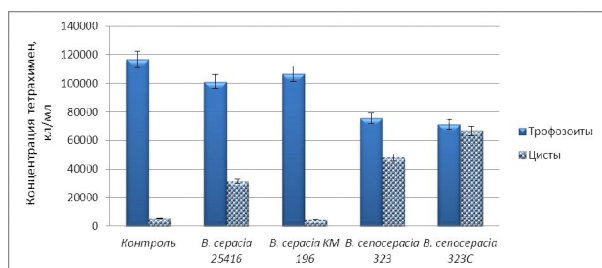


Рис. 4. Соотношение трофозоитов и цист в сокультуре *T. pyriformis* с различными штаммами *B. seracia* через 72 ч после начала контакта,  $p < 0,05$

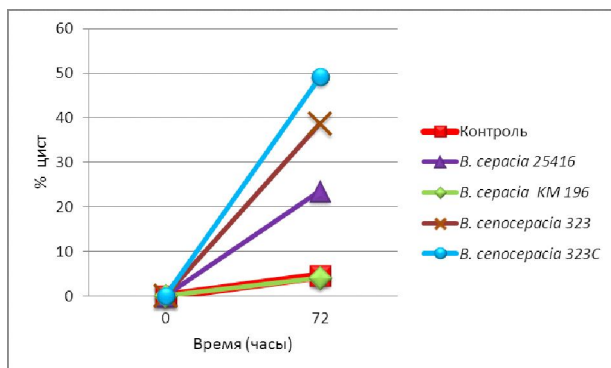


Рис. 5. Отношение количества образовавшихся цист к общему количеству клеток *T. pyriformis* через 3 сут. совместного инкубирования с буркхольдериями, выраженное в процентах

Последний факт согласуется с известными литературными данными о том, что культуры *B. seracia*, как и других микроорганизмов, выделенные из цист простейших, приобретают повышенную инвазивность и вирулентность [2].

Ранее при оценке вирулентности штаммов *B. seracia* для экспериментальных животных было установлено, что штамм *B. senoserasia* 323, обнаруживший в данном исследовании наибольшую цитотоксичность для тетрахимен, был также более вирулентным для золотистых хомячков, чем *B. seracia* 25416 и другие испытанные штаммы [4]. В связи с этим, заслуживает внимания характеристика цитотоксичности мутанта *B. seracia* KM 196, производного штамма 25416 с дефектом в функции порообразующего белка Орсп1 и фенотипом множественной чувствительности к антибиотикам [3], который практически не оказывал влияния на инцистирование, что, по-видимому, коррели-

рует с отсутствием у него вирулентности для золотистых хомячков. Во всяком случае, исследования, проведенные на большой группе мутантных штаммов *B. seracia* и родственных ей патогенных буркхольдерий *B. pseudomallei* и *B. mallei* с измененной чувствительностью к антибиотикам, показали отчетливое снижение у них вирулентности для экспериментальных животных по сравнению с микроорганизмами дикого типа [4].

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Показано, что микроорганизмы комплекса *B. seracia* резистентны к фагоцитирующей активности ресничных инфузорий вида *T. pyriformis* и в сокультуре ними могут сохраняться длительное время (срок наблюдения 14 сут.). Цитотоксическое действие буркхольдерий на клетки тетрахимен проявляется в инцистировании инфузорий. Интенсивность процесса цистообразования находится в зависимости от штамма. При этом наиболее выраженным цистообразующим (цитотоксическим) эффектом обладает штамм *B. senoserasia* 323, клинический изолят с повышенной вирулентностью для экспериментальных животных. Цитотоксичность этого штамма увеличивается после пребывания его культуры (3 месяца) в цистах тетрахимен.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Антонов В. А., Илюхин В. И., Сенина Т. В. и др. // Журн. микробиол. — 2008. — № 4. — С. 78—82.
2. Каминская А. А., Пушкарева В. И., Ермолаева С. А. и др. // Успехи соврем. биол. — 2007. — № 1. — С. 44—49.
3. Меринова О. А., Молчанова Е. В., Захарова И. Б. и др. // Вестник ВолГМУ. — 2011. — № 3. — С. 72—75.
4. Молчанова Е. В. Фенотипическая и генотипическая характеристика мутантов патогенных видов рода Burkholderia с измененной чувствительностью к антибиотикам: Автореф. дис. канд. биол. наук. — Волгоград, 2010. — С. 15.
5. Пушкарева В. И., Величко В. В., Каминская А. А. и др. // Журн. микробиол. — 2005. — № 3. — С. 39—44.
6. Bernier S. P., Silo-Suh L., Woods D. E., et al. // Infection and Immunity. — 2003. — Vol. 71. — P. 5306—5313.
7. Chu K. K., Davidson D. J., Halsey T. K., et al. // Infect. Immun. — 2002. — Vol. 70. — P. 2715—2720.
8. Cieri M. V., Mayer-Hamblett N., Griffith A., Burns J. L. // Infect. Immun. — 2002. — Vol. 70. — P. 1081—1086.
9. Govan J. R., Brown A. R., Jones A. M. // Future microbiology. — 2007. — Vol. 2. — P. 153—164.
10. Kazachkov M., Lager J., LiPuma J., Barker P. M. // Pediatr Pulmonol. — 2001. — Vol. 32. — P. 338—340.
11. Landers P., Kerr K.G., Rowbotham T. J., et al. // J. Clin. Microbiol. — 2000. — Vol. 19. — P. 121—123.
12. Pushkareva V. I., Ermolaeva S.A. // BMC Microbiol. — 2010. — № 10. — P. 26.
13. Taylor J. B., Hogue L. A., Walter M. J., et al. // J. Cyst. Fibros. — 2009. — Vol. 9. — P. 36—43.

## Контактная информация

Король Екатерина Васильевна — научный сотрудник лаборатории генетики, ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора, Волгоград, Россия, e-mail: vari2@sprint-v.com.ru