

КОМПЛЕМЕНТАЦИЯ У *BURKHOLDERIA CEPACIA* ДЕФЕКТА В ИЗМЕНЕННОЙ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ К АНТИБИОТИКАМ И ПРОДУКЦИИ ПОРИНА ОРСР1 С ПОМОЩЬЮ ТРАНСФОРМАЦИИ

**О. А. Меринова, Е. В. Молчанова, И. Б. Захарова, Е. А. Товба,
Д. В. Викторов, Л. К. Меринова**

Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт

В формировании резистентности множественного типа у *B. cepacia* 25416 принимает участие мажорный порин наружной мембраны ОрсР1. Роль белка-порина ОрсР1 как компонента транспортной системы клеток *B. cepacia* в развитии резистентности к антибактериальным препаратам различных групп подтверждена комплементацией дефекта по продукции белка Mr 36 kDa, сопровождающейся восстановлением устойчивости к пefлоксацину и цефтазидиму и выявлением специфического продукта полимеразной цепной реакции, соответствующего последовательности ОрсР1 генов при трансформации гомологичной дезоксирибонуклеиновой кислоты исходного штамма.

Ключевые слова: комплементация, *Burkholderia cepacia*, антибиотики, трансформация, порин ОрсР1.

COMPLEMENTATION OF DEFECT IN MODIFIED SENSITIVITY TO ANTIBIOTICS AND PRODUCTION OF PORIN OPCS1 BY TRANSFORMATION IN *BURKHOLDERIA CEPACIA*

O. A. Merinova, E. V. Molchanova, I. B. Zakharova, E. A. Tovba, D. V. Viktorov, L. K. Merinova

NSP mutants of *B. cepacia* 25416 with multiple sensitivity to antibiotics and defective in expression of porin OpcP1 (Mr 36 kDa) were obtained by chemical mutagenesis. Transformation of the NSP mutant with parental strain DNA complements antibiotic resistance and restores production of porin OpcP1. PCR-analysis reveals the sequence of the ocsP1 gene in transformants.

Key words: complementation, *Burkholderia cepacia*, antibiotics, transformation, porin OpcP1.

Burkholderia cepacia — типовой вид рода *Burkholderia*, естественный обитатель воды, почвы и ризосферы, известный также, как возбудитель оппортунистических инфекций, тяжелых нозокомиальных пневмоний и *cepacia*-синдрома у лиц с иммунодефицитными состояниями [7, 9]. Микроорганизм отличается высокой природной резистентностью к различным ингибиторам, включая антибиотики. Дополнительная устойчивость *B. cepacia* к антибактериальным препаратам легко развивается в процессе лечения, существенно отягощая прогноз вызываемых ею инфекций [4, 5, 12].

Определенная роль в формировании множественной лекарственной резистентности у ряда бактерий, в том числе у *B. cepacia*, принадлежит молекулярным механизмам, связанным с активным выбросом ингибиторов из клетки и снижением общей проницаемости клеточной оболочки в результате изменения экспрессии поринов наружной мембраны [10, 11].

Ранее мы показали, что полученные методом направленной селекции мутанты патогенных буркхольдерий, резистентные к препаратам классов фторхинолонов и цефалоспоринов, одновременно приобретают устойчивость множественного типа к ряду антибиотиков. При этом полирезистентные штаммы *B. cepacia* отличались составом белков наружных мембран с Mr 200, 150, 71, 21 kDa и увеличением продукции мажорного протеина с Mr 36 kDa, известного как порин ОрсР1 [1].

ЦЕЛЬ РАБОТЫ

В получении мутантов *B. cepacia* с повышенной чувствительностью к фторхинолонам и цефалоспоринам, комплементации дефекта антибиотикочувствительности с помощью трансформации и анализе у трансформантов экспрессии мембранных протеинов.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

В работе использовали штамм *B. cepacia* ATCC 25416. Культуры микроорганизма выращивали при 32 °С 24—48 ч на плотных и в жидких питательных средах фирмы «Difco» (США). Минимальные подавляющие концентрации (МПК) антибактериальных препаратов определяли общепринятым методом кратных разведений. Для получения мутантов, чувствительных к антибиотикам, использовали химический мутагенез [2]. Культуры штамма *B. cepacia* 25416 в экспоненциальной фазе роста обрабатывали N-метил-N'-нитро-N-нитрозогуанидином (НГ) в интервале концентраций от 0,01 до 1 % в течение 15, 30 и 60 мин, центрифугировали для удаления реагента и высевали для получения изолированных колоний на L-агар.

Выделение хромосомной дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) и дальнейшую трансформацию штамма *B. cepacia* 25416 в системе CaCl₂, а также методом замораживания-оттаивания при -30 °С и в жидком азоте проводили в соответствии с рекомендациями Маниатиса [2].

Для амплификации последовательности *OpcP1* использовали олигонуклеотидные праймеры, фланкирующие полную кодирующую последовательность гена *otp39*: прямой праймер *bpsomp39s* (ATGAACAAGACTCTGATTGTTGCA), обратный праймер *bpsomp39as* (GAAGCGGTGACGCAGACCAA) [13]. Амплификацию проводили по программе: начальный прогрев 95 °С 5 мин, 35 реакционных циклов (94 °С 30 с, 57 °С 30 с, 72 °С 60 с), финальная элонгация 72 °С 10 мин. Электрофоретический анализ ПЦР-ампликонов проводили в 1,5—2 % агарозных гелях, окрашивая ДНК бромистым этидием.

Для выделения клеточных мембран *Burkholderia* применяли методические приемы Hancock, Nikhaido [6]. Анализ препаратов белков проводили по методу Laemmli [8].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Природная резистентность микроорганизмов комплекса *B. ceracia* к антибиотикам отличается широким спектром, включающим препараты различных классов. В терапии инфекций, вызываемых этим микроорганизмом, эффективны различные комбинации антибиотиков, в том числе цефалоспорины и фторхинолоны [12]. Мутанты с измененной чувствительностью к указанным ингибиторам являются целесообразной экспериментальной моделью для изучения молекулярно-генетических механизмов резистентности *B. ceracia*.

Определение антибиотикограмм исходного штамма *B. ceracia* 25416 показало высокую устойчивость его к ряду препаратов, при этом резистентность к цефалоспорином (цефтазидиму) и фторхинолонам (пемфлоксацину, офлоксацину) была значительно ниже, МПК их не превышала 20—30 мкг/мл.

Мутантные клоны *B. ceracia*, чувствительные к пемфлоксацину и цефтазидиму, после воздействия на культуры нитрозогуанидина отбирали на селективных средах с антибиотиками в концентрации в 5—10 раз ниже МПК для исходного штамма. У мутантов, показавших повышенную чувствительность к исследуемым препаратам, определяли устойчивость к антибиотикам других классов (табл. 1).

Из табл. 1 следует, что штаммы, утратившие устойчивость к одному из селективных препаратов, снизили свою резистентность к ряду других антибиотиков, отличающихся по механизму действия, что указывало на сформированную чувствительность как множественную.

Как было установлено ранее, повышение резистентности *B. ceracia* к антибиотикам сопровождается изменением состава ряда мажорных белков наружных мембран с некоторым возрастанием протеина Mr 36 kDa [1].

Проведенный нами анализ мембранных белков штаммов *B. ceracia* с фенотипом множественной чувствительности к антибиотикам показал наличие дефектов в продукции мажорных мембранных белков Mr 110, 36, 27, 21 kDa и отсутствие экспрессии белка с Mr 36 kDa (рис. 1).

Устойчивость к антибиотикам, индуцированным нитрозогуанидином мутантов *B. ceracia*

Штаммы <i>B. ceracia</i>	Фенотип	МПК, мкг/мл					
		Cfz	Pfx	Ofx	Tet	Kan	Chl
8235	W.t	25	10	25	300	200	30
ATCC 25416	W.t	30	10	20	200	250	50
8235 NSP	Tet ^s Kan ^s Chl ^s Pfx ^s Cfz ^s	3	4	3	2	50	3
25416 NSK	Kan ^s Tet ^s Chl ^s Pfx ^s Cfz ^s	2	2	10	2	10	2
25416 NSP	Pfx ^s Tet ^s Kan ^s Chl ^s Cfz ^s	2	1	1	1	20	1
25416 NSP-1	Tet ^s Kan ^s Chl ^s Pfx ^s Cfz ^s	3	4	10	1	10	2
25416 NSP-2	Chl ^s Tet ^s Kan ^s Pfx ^s Cfz ^s	3	10	10	3	20	1

Примечание. Здесь и далее: Cfz — цефтазидим, Pfx — пемфлоксацин, Ofx — офлоксацин, Chl — хлорамфеникол, Tet — тетрациклин, Gen — гентамицин, Kan — канамицин, Str — стрептомицин, Amp — ампициллин.

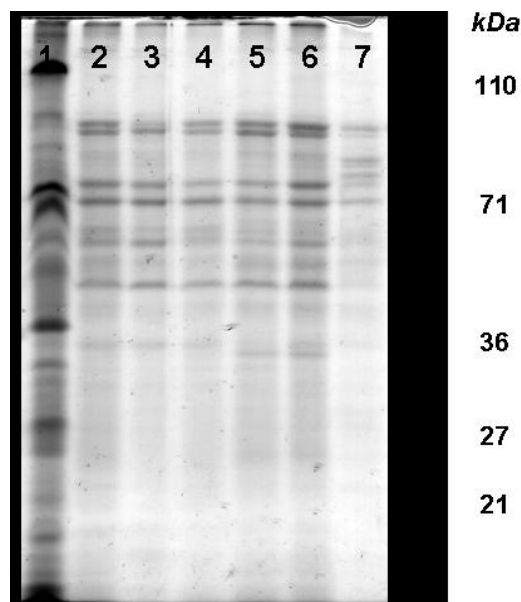


Рис. 1. SDS-PAGE мембранных белков исходного и мутантных штаммов *B. ceracia* с множественной чувствительностью к антибиотикам:

- 1 — *B. ceracia* ATCC 25416; 2 — *B. ceracia* 25416 NSP-3;
- 3 — *B. ceracia* 25416 NSP-4; 4 — *B. ceracia* 25416 NSP-5;
- 5 — *B. ceracia* 25416 NSP-6; 6 — *B. ceracia* 25416 NSK;
- 7 — *B. ceracia* 25416 NSP

В целом белковые спектры наружных мембран выделенных чувствительных мутантов характеризовались высокой степенью сходства, что косвенно может свидетельствовать о сходном характере мутационных изменений, приведших к формированию селектированных фенотипов.

Исходя из возможной связи между изменением резистентности штамма и уровнем в экспрессии белка-порина Mr 36 kDa, участвующего как в транспорте моносахаров, так и низкомолекулярных антибиотиков

[13], мы предположили, что при восстановлении антибиотикостойчивости одновременно может наблюдаться компенсация дефекта в продукции порина.

Для восстановления фенотипа антибиотикорезистентности полученные мутанты *B. ceracia* 25416 NSP-типа с множественной чувствительностью трансформировали хромосомной ДНК исходного штамма. В заданных условиях формирования компетентности образование трансформантов с повышенной устойчивостью к антибиотикам происходило с частотой $n \times 10^{-6}$.

У полученных трансформантов далее исследовали перекрестную антибиотикорезистентность (табл. 2).

Таблица 2

Уровень резистентности к антибиотикам трансформантов *B. ceracia* 25416 NSPT

Штаммы	МПК антибиотиков, мкг/мл				
	Tet	Chl	Kan	Cfz	Pfx
<i>B. ceracia</i> ATCC 25416 W.t.	300	50	250	30	10
<i>B. ceracia</i> 25416 NSP	0,5	5	20	5	1
<i>B. ceracia</i> 25416 NSPT-1	1	5	20	10	5
<i>B. ceracia</i> 25416 NSPT-2	0,5	7,5	30	7,5	7,5
<i>B. ceracia</i> 25416 NSPT-3	0,5	7,5	30	7,5	7,5
<i>B. ceracia</i> 25416 NSPT-4	0,5	7,5	30	5	7,5

Как видно из табл. 2, у трансформантов *B. ceracia* 25416 NSPT-1, NSPT-2, NSPT-3, NSPT-4 отчетливо повысилась резистентность к пefлоксацину, частично возросла устойчивость к цефтазидиму, а также к канамицину и хлорамфениколу.

Сравнительный анализ мембранных протеинов трансформантов показал полное восстановление у них продукции порина ОрсР1 с Мг 36 kDa (рис.2).

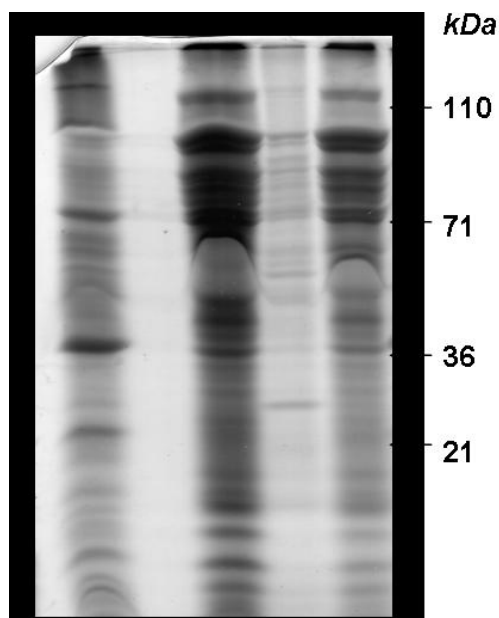


Рис. 2. SDS-PAGE белков наружной мембраны трансформантов *B. ceracia* 25416 NSPT:

1 — *B. ceracia* ATCC 25416; 2 — *B. ceracia* 25416 NSP; 3 — *B. ceracia* 25416 NSPT-1; 4 — *B. ceracia* 25416 NSPT-2; 5 — *B. ceracia* 25416 NSPT-3

Ранее, в штамме *B. ceracia* 25416 и его резистентных мутантах с помощью ПЦР-анализа было обнаружено наличие специфической последовательности поринового гена *orsP1/otr39* размером около 1000 п.н. [3]. Для выявления этой последовательности в полученных трансформантах ДНК амплифицировали с использованием праймеров bpsomp39s- bpsomp39as [13].

Проведенный ПЦР-анализ продемонстрировал восстановление гена, кодирующего продукцию порового белка 36kDa у трансформантов, устойчивых к пefлоксацину при наличии дефекта в последовательности ОрсР1 у чувствительного мутанта (рис. 3).

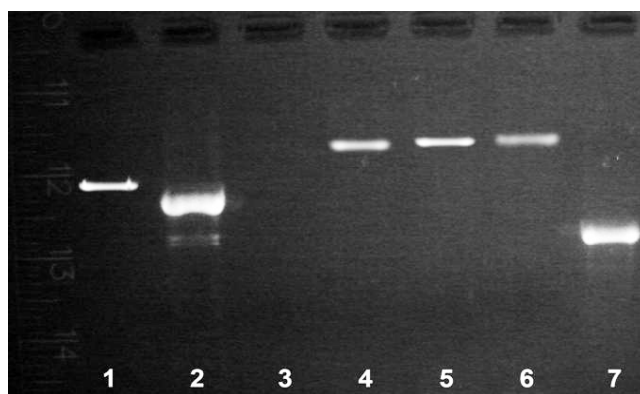


Рис. 3. ПЦР-анализ последовательности ОрсР1 в штаммах *B. ceracia*:

1 — *B. ceracia* ATCC 25416; 2 — маркер (700 п.н.); 3 — *B. ceracia* 25416 NSP; 4 — *B. ceracia* 25416 NSPT-1; 5 — *B. ceracia* 25416 NSPT-2; 6 — *B. ceracia* 25416 NSPT-3; 7 — маркер (480 п.н.)

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в формировании резистентности множественного типа у *B. ceracia* принимает участие мажорный порин наружной мембраны ОрсР1. Роль белка-порина ОрсР1 как компонента транспортной системы клеток *B. ceracia* в развитии резистентности к антибактериальным препаратам различных групп подтверждена комплементацией дефекта по продукции белка Мг 36 kDa, сопровождающейся восстановлением устойчивости к пefлоксацину и цефтазидиму и выявлением специфического ПЦР-продукта, соответствующего последовательности *orsP1* генов при трансформации гомологичной ДНК исходного штамма.

ЛИТЕРАТУРА

1. Калинкина Е. В., Меринова О. А., Агеева Н. П. и др. // Пробл. особо опасн.инф. — 2008. — № 1. — С. 32—34.
2. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Д. Молекулярное клонирование / Пер. с англ. — М.: Мир, 1984. — 392 с.
3. Молчанова Е. В., Захарова И. Б., Меринова О. А. и др. // Мат. Межгос. науч.-практ. конф. государств-участников СНГ. — Ставрополь, 2010. — С. 212—213.
4. Burns J. L., Wadsworth C. D., Barry J. J. // Antimicrob Agents Chemother. — 1996. — Vol. 40. — P. 307—313.
5. Gibson R. L., Burns J. L., Ramsey B. W. // Am. J. Resp. Crit. Care Med. — 2003. — Vol. 168. — P. 918—951.

6. Hancock R., Nikaido H. // J. Bacteriol. — 1978. — Vol. 136. — P. 381—390.

7. Herasimenka G., Cescutti P., Sampaio N. // Carbohydr. Res. — 2007. — № 10. — P. 570—575.

8. Laemmli U. K. // Nature. — 1970. — Vol. 227. — P. 680—685.

9. Mahenthiralingam E., Bischof J., Byrne S. K., et al. // J. Clin. Microbiol. — 2000. — Vol. 38. — P. 3165—3173.

10. Moore A., DeShazer D., Reckseidler S., Weissman A., et al. // Antimicrob. Agents Chemother. — 1999. — Vol. 43. — P. 465—470.

11. Pages J. M., Masi M., Barbe J. // Trends Mol. Med. — 2005. — Vol. 11. — P. 382—389.

12. Saiman L., Siegel J. // J. Clin. Microbiol. Rev. — 2004. — Vol. 17. — P. 57—71.

13. Siritapetawee J., Prinz H., Samosornsuk W. // Biochem. J. — 2004. — Vol. 377. — P. 579—587.

Контактная информация

Меринова Людмила Константиновна — д. м. н., профессор, заведующая лабораторией ФГУЗ «Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт», e-mail: vari2@sprint-v.com.ru

УДК 616.12-008.331.1:312.2

УЯЗВИМЫЕ ВОЗРАСТНО-ПОЛОВЫЕ ГРУППЫ РИСКА СМЕРТНОСТИ ОТ ОСЛОЖНЕНИЙ АРТЕРИАЛЬНОЙ ГИПЕРТОНИИ В г. АСТРАХАНИ

Г. Н. Афанасьева, Т. Н. Панова

Астраханская государственная медицинская академия

Проанализировав 6933 случая смерти в стационаре от сердечно-сосудистых заболеваний с артериальной гипертензией (АГ) и без АГ, установили, что АГ вносит решающий вклад в показатели смертности от сердечно-сосудистых заболеваний. Большинство случаев смерти от осложнений АГ среди женщин приходится на возрастные группы 70—79 лет, среди мужчин — 60—69 лет. Наиболее уязвимыми по смертности от осложнений АГ в стационарах среди женщин является возрастной период до 59 лет, среди мужчин — до 49 лет.

Ключевые слова: смертность, артериальная гипертензия, ишемическая болезнь сердца, инфаркт миокарда, цереброваскулярная болезнь, мозговой инсульт.

VULNERABLE AGE AND SEX RELATED GROUPS WITH RISK OF DEATH FROM ARTERIAL HYPERTENSION COMPLICATIONS IN THE CITY OF ASTRAKHAN

G. N. Afanasyeva, T. N. Panova

Having analyzed 6933 cases of hospital deaths from cardiovascular diseases with and without AH we established that AH makes the greatest contribution to death rate from cardiovascular diseases. Most cases of death with AH complications among females occurred at ages 70—79, among males — 60—69. The age most vulnerable to death from AH complications in hospital was 59 for females, 49 for males.

Key words: death rate, arterial hypertension (AH), ischemic heart diseases, myocardium infarction, cerebrovascular disease, cerebral stroke.

Многочисленные международные исследования доказали связь между уровнем артериального давления (АД) и высоким риском развития ишемической болезни сердца (ИБС), инфаркта миокарда (ИМ), мозговых инсультов (МИ), хронической сердечной недостаточности (ХСН), сердечно-сосудистой и общей смертности [1]. По данным литературы, в России в среднем каждый 14-й мужчина (7,1 %) в возрасте 20—29 лет имеет АГ, в возрасте 30—39 лет — каждый 6-й (16,3 %), 40—49 лет — каждый 4-й (26,9 %), а в возрасте 50—54 лет этим заболеванием страдает уже каждый 3-й мужчина (34,4 %). Распространенность АГ в России среди женщин также высока. Об этом свидетельствуют данные одномоментного эпидемиологического исследования, проведенного в Москве (Краснопресненский рай-

он) среди мужского и женского населения 20—69 лет. В целом среди мужского и женского населения 20—69 лет распространенность АГ одинакова: ею страдают каждый 5-й мужчина и каждая 5-я женщина (соответственно 22,3 и 21,8 %). Однако имеются существенные, связанные с полом, различия в возрастной динамике распространенности этой патологии: если от 20—49 лет у мужчин и женщин распространенность АГ с возрастом увеличивается одинаково, то от 40—69 лет показатель у мужчин изменяется мало (32,8—41,1 %), в то время как у женщин он продолжает стремительно увеличиваться по сравнению с возрастной группой 40—49 лет, вдвое в 50—59 лет (34,7 %) и втрое — в 60—69 лет (57,6 %), что, по-видимому, связано с наступлением менопаузы [2].