

Заключение. Таким образом, результаты проведенных исследований показали ограниченную абсорбцию диклазурила, связанную с плохим всасыванием препарата в желудочно-кишечном тракте, что обуславливает способность униккокцида оказывать свое антикокцидийное действие на слизистой оболочке и в подслизистом слое кишечника.

Литература. 1. Новиков, П. В. Методические положения по борьбе с эймериозом кур в фермерских и личных хозяйствах / П. В. Новиков, Р. Т. Сафиуллин // Российский паразитологический журнал. - 2015. - № 4. - С. 109-113. 2. Худяков А.А. Методические положения по борьбе с кокцидиозами свиней в хозяйствах промышленного типа / А. А. Худяков, Р. Т. Сафиуллин // Российский паразитологический журнал. - 2015. - Вып. 3. - С. 106-109. 3. Lamb eimeriosis: applied treatment protocols in dairy sheep production systems / A. Saratsis [et al.] // Vet. Parasitol. - 2013. - Sep 1;196 (1-2). - P. 56-63. 4. Влияние применения препарата униккокцид на качество мяса птицы / Г. А. Востроилова, И. Д. Шелякин, Л. В. Ческидова, Ю. В. Шапошникова // Вестник ВГАУ. - 2017. - № 4 (55). - С.74-78. 5. Conway, D. P. The use of diclazuril in extended withdrawal anticoccidial programs: 1. Efficacy against *Eimeria* spp. in broiler chickens in floor pens / D. P. Conway, G. F. Mathis, M. Lang // Poult Sci. - 2002. - 81 (3). - P. 349-352. 6. Efficacy of diclazuril in comparison with chemical and ionophorous anticoccidials against *Eimeria* spp. in broiler chickens in floor pens / D. P. Conway [et al.] // Poult Scs. - 2001. - Apr; 80 (4). - P. 426-430. 7. Histopathological observations on the activity of diclazuril (Vecoxan) against the endogenous stages of *Eimeria crandallis* in sheep / M. A. Taylor, J. Catchpole, R. N. Marshall, D. Hoeven // Vet Parasitol. - 2003. - Oct 30; 116 (4). - P. 305-314. 8. Efficacy of diclazuril and toltrazuril in the prevention of coccidiosis in dairy calves under field conditions / G. Zechner [et al.] // Vet Rec. - 2015. - Jan 31;176 (5). - P. 126. 9. Investigation for the characteristic anticoccidial activity of diclazuril in battery trials / T. Matsuno [et al.] // J. Vet. Med. Sci. - 1996. - Feb; 58 (2). - P. 129-133. 10. Guidance for Industry: Bioanalytical method validation. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evolution and Research (CDER). Center for Veterinary Medicine (CVM). - London, 2013. 11. Элштейн, Н. А. Оценка пригодности (валидации) ВЭЖХ методик в фармацевтическом анализе (обзор) / Н. А. Элштейн // Химико-фармацевтический журнал. - 2004. - Т. 38, №4. - С. 40-56. 12. Validation on bioanalytical chromatographic methods / C. Hartmann [et al.] // J. Pharm. Biomed. Anal. - 1998. - № 17. - P. 193-218. 13. An Analysis of the SFSTP guide on Validation of Chromatographic bioanalytical Methods: Progress and Limitations / P. Chiap [et al.] // J. Pharm. Biomed. Anal. - 2003. - №32. - P. 3-10. 14. Guidance for Industry: Bioanalytical method validation. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evolution and Research (CDER). U.S. Government Printing Office: Washington, DC, 2001. 15. Guideline on validation of bioanalytical methods (draft). European Medicines Agency. Committee for medicinal products for human use: London, 2009.

Статья передана в печать 27.09.2018 г.

УДК 517.218:579.8

ИЗУЧЕНИЕ ОТНОСИТЕЛЬНОГО УРОВНЯ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ ФЕРМЕНТОВ РЕПАРАЦИИ ДНК МИКРООРГАНИЗМОВ

Востроилова Г.А., Паршин П.А., Пасько Н.В., Королькова А.О., Масютина О.Н., Левченко В.В.

ГНУ «Свероссийский научно-исследовательский ветеринарный институт патологии, фармакологии и терапии Россельхозакадемии», г. Воронеж, Российская Федерация

Многолетние наблюдения наглядно демонстрируют, что устойчивость микроорганизмов к антимикробным средствам становится все более актуальной и серьезной проблемой ветеринарии, препятствующей эффективному лечению больных животных с инфекциями бактериальной этиологии. Гены устойчивости к антимикробным веществам в разной степени имеются у подавляющего большинства микроорганизмов, даже у штаммов, ранее не подвергавшихся воздействию антибиотиков. Важную роль в устойчивости бактерий играют и системы репарации поврежденных молекул ДНК и РНК. Исследовали исходные культуры, а также культуры после 40 и 60 пассажей в мясопептонном бульоне (МПБ), содержащем возрастающие суббактериостатические концентрации апрамицина, цефотаксима и комплексного на их основе препарата К-2. Изучение паттернов экспрессии генов ферментов репарации ДНК показывает, что в процессе формирования резистентности путем культивирования бактерий в МПБ, содержащем возрастающие суббактериостатические концентрации препаратов, происходит изменение представленности транскриптов генов ферментов репарации ДНК. Полученные результаты могут быть использованы для актуализации исследований по установлению генетических маркеров предрасположенности к экологически детерминированным заболеваниям, для расширения доказательной базы причинно-следственных связей в системе «среда – здоровье», для своевременного выявления «групп риска» и повышения эффективности профилактических мероприятий. **Ключевые слова:** экспрессия генов, репарация, ферменты, ДНК, бактерии.

STUDY OF THE RELATIVE LEVEL OF EXPRESSION OF THE GENES OF THE ENZYMES OF DNA REPRODUCTION OF MICROORGANISMS

Vostroilova G.A., Parshin P.A., Pasko N.V., Korolkova A.O., Masyutina O.N., Levchenko V.V.

State Scientific Institution All-Russian Veterinary Research Institute of Pathology, Pharmacology and Therapy of the Russian Academy of Agricultural Sciences, Voronezh, Russian Federation

Long-term observations clearly demonstrate that the resistance of microorganisms to antimicrobial agents is becoming more and more urgent and a serious veterinary problem that prevents the effective treatment of sick animals

with infections of bacterial etiology. The genes for resistance to antimicrobial substances are to varying degrees present in the vast majority of microorganisms, even in strains that have not previously been exposed to antibiotics. An important role in the stability of bacteria is played by systems for repairing damage to DNA and RNA molecules. Initial cultures were studied, as well as cultures after 40 and 60 passages in meat-peptone broth (MPB) containing increasing sub-bacteriostatic concentrations of apramycin, cefotaxime and complex K-2 preparation on their basis. The study of patterns of gene expression of DNA repair enzymes shows that during the formation of resistance by cultivation of bacteria in the MPB containing increasing sub-bacteriostatic concentrations of the preparations, the transcript of the DNA repair enzyme genes is changing. The obtained results can be used to update the research on the establishment of genetic markers of predisposition to environmentally determined diseases, to expand the evidence base of cause-effect relationships in the "environment-health" system, to identify "risk groups" in a timely manner and to increase the effectiveness of preventive measures. **Keywords:** gene expression, repair, enzymes, DNA, bacteria.

Введение. Действие факторов, оказывающих негативное влияние на организм (токсические вещества, повышенный уровень загрязнения окружающей среды, ультрафиолетовое и ионизирующее излучение), приводит к повреждению геномной ДНК. Для защиты от необратимых мутаций разнообразные повреждения элиминируются различными путями репарации ДНК. Механизмы репарации, осуществляющие исправление повреждений ДНК, обеспечивают сохранение заложенной в ней генетической информации. Действие многих экзогенных и эндогенных токсических агентов прямо либо опосредованно вызывает генотоксический стресс с последующим повреждением геномной ДНК [1, 2]. В последние годы убедительно показано, что бактерицидные антимикробные вещества, помимо воздействия на свои первичные мишени, оказывают широкий спектр вторичных эффектов, таких как повреждение молекул ДНК, перекисное окисление липидов и окислительная модификация белков. Важную роль в устойчивости бактерий к антимикробным веществам играют системы репарации повреждений молекул ДНК и РНК. Вместе с вышеизложенным необходимо отметить то, что огромное разнообразие ксенобиотиков, включая лекарственные вещества, попадая в организм животных и человека, включается в процессы метаболизма с участием специализированных ферментных систем [3, 4, 5]. Поэтому крайне важно выяснить, может ли действующее вещество служить индуктором ферментов метаболизма ксенобиотиков. Такого рода исследования особенно актуальны на начальной стадии разработки новых терапевтических агентов. Полученные результаты могут быть использованы для актуализации исследований по установлению генетических маркеров предрасположенности к экологически детерминированным заболеваниям.

Важная роль в нивелировании подобного рода эффектов принадлежит функционированию и регулированию экспрессии различных ферментов нуклеинового обмена, таких как формамидопиримидин-ДНК-гликозилаза (gluc), пептид-метионин (S)- S-окисиредуктаза (red), глутатионредуктаза (glut), белок теплового шока 16 кДа (hspB), молекулярный шаперон Hsp33 (Hsp33) и некоторым другим [6, 7, 8].

Материалы и методы исследований. Исследования проведены на базе отдела фармакологии и лаборатории молекулярно-генетического анализа научного исследовательского центра по оценке качества и безопасности сырья, продукции и материалов ГНУ ВНИВИПФиТ Россельхозакадемии. Объектами для исследований служили различные клоны штамма *E. coli* 866, устойчивые к разработанным ранее комплексным антимикробным препаратам и составляющим их активными действующим веществам. Исследовались исходная культура, а также культуры после 40 и 60 пассажей в мясопептонном бульоне (МПБ), содержащем возрастающие суббактериостатические концентрации апрамицина, цефотаксима и комплексного на их основе препарата К-2.

Изучение формирования резистентности у *E. coli* 866 к препаратам производилось в соответствии с «Руководством по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ» [9]. Выделение плазмидной ДНК из бактериальных клеток производилось методом щелочного лизиса [10] и последующим связыванием на селективных мембранах микроспиновых колонок [11] с использованием набора для выделения плазмидной ДНК «GeneJET Plasmid Miniprep Kit» («Thermo Scientific», Литва) согласно рекомендациям фирмы-производителя. Амплификация фрагментов изучаемых генов осуществлялась по схеме трехшаговой полимеразной цепной реакции. Число циклов амплификации – 55. Значения пороговых циклов определялись при помощи программного обеспечения Rotor-Gene 6000 (Австралия), определение относительного уровня экспрессии исследуемых генов осуществляли с применением $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -метода. Нормализация данных проводилась относительно контрольной группы, в качестве которой использовалась исходная (чувствительная) культура.

Результаты исследований. В результате изучения паттернов экспрессии генов ферментов репарации ДНК было установлено (рисунок 1), что при применении цефотаксима после 40-го пассажа наблюдали снижение уровня формамидопиримидин-ДНК-гликозилазы (gluc) (0,097 раз), пептид-метионин (S)- S-окисиредуктазы (red) (0,429 раз), глутатионредуктазы (glut) (0,000003 раза), белка теплового шока 16 кДа (hspB) (0,054 раза), молекулярного шаперона Hsp33 (Hsp33) (0,823 раза). К 60 пассажу происходило изменение представленности соответствующих транскриптов. В этот период отмечали динамичное снижение уровня формамидопиримидин-ДНК-гликозилазы (gluc) (0,002 раза) и молекулярного шаперона Hsp33 (Hsp33) (0,071 раз). При этом устанавливалось повышение уровня пептид-метионин(S)-S-окисиредуктазы (red) (5,388 раза), глутатионредуктазы (glut)

(1,986 раз), белка теплового шока 16 кДа (hspB) (248,999 раз).

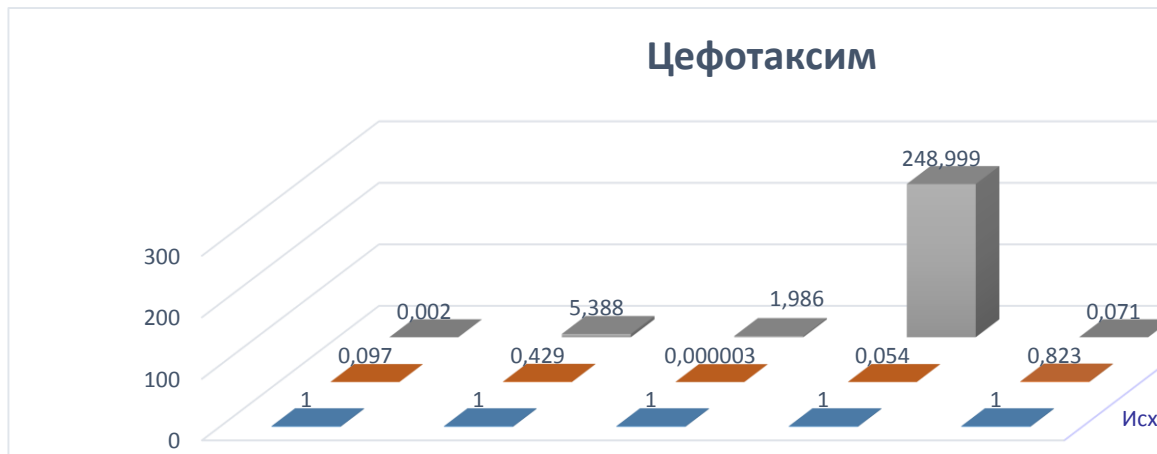


Рисунок 1 - Относительный уровень экспрессии генов formamidopyrimidine-DNA glycosylase (glyc), peptide-methionine (S)-S-oxide reductase (red), glutathione reductase (glut), 16 kDa heat shock protein B (hspB), molecular chaperone Hsp33 (Hsp33) у *E. coli* 866 в процессе формирования резистентности к цефотаксиму

При изучении паттернов экспрессии генов ферментов репарации ДНК было установлено (рисунок 2), что при применении апрамицина после 40-го пассажа наблюдалось снижение уровня формамидопиримидин-ДНК-гликозилазы (glyc) (0,01 раз) и глутатионредуктазы (glut) (0,004 раз), повышение уровня пептид-метионин (S)-S-окисиредуктазы (red) (31,778 раза), белка теплового шока 16 кДа (hspB) (879,171 раз) и молекулярного шаперона Hsp33 (Hsp33) (1,624 раз). После 60-го пассажа отмечалось изменение представленности соответствующих транскриптов. В этот период отмечалось динамичное снижение уровня пептид-метионин (S)-S-окисиредуктазы (red) (20,821 раз), белка теплового шока 16 кДа (hspB) (0,266 раз), молекулярного шаперона Hsp33 (Hsp33) (0,417 раз). При этом устанавливалось повышение уровня глутатионредуктазы (glut) (0,532 раз).



Рисунок 2 - Относительный уровень экспрессии генов formamidopyrimidine-DNA glycosylase (glyc), peptide-methionine (S)-S-oxide reductase (red), glutathione reductase (glut), 16 kDa heat shock protein B (hspB), molecular chaperone Hsp33 (Hsp33) у *E. coli* 866 в процессе формирования резистентности к апрамицину

Изучением паттернов экспрессии генов ферментов репарации ДНК было установлено (рисунок 3), что при применении комплексного препарата на основе цефотаксима и апрамицина К-2 после 40-го пассажа наблюдалось повышение уровня формамидопиримидин-ДНК-гликозилазы (glyc) (3,68 раз), повышение уровня пептид-метионин (S)-S-окисиредуктазы (red) (4153,178 раз), глутатионредуктазы (glut) (26,172 раз), белка теплового шока 16 кДа (hspB) (10085,535 раз) и молекулярного шаперона Hsp33 (Hsp33) (60,547 раз).

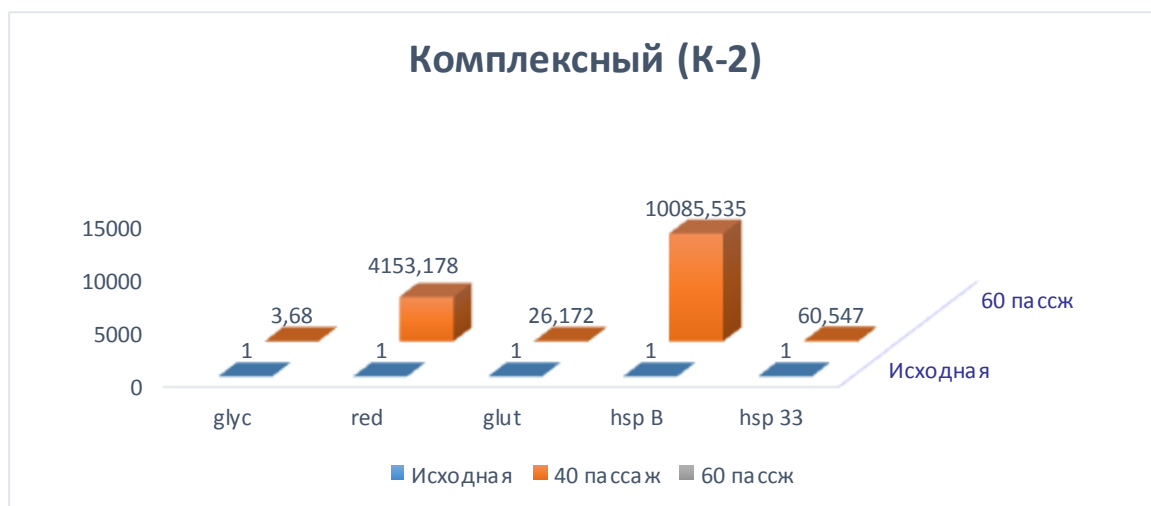


Рисунок 3 - Относительный уровень экспрессии генов formamidopyrimidine-DNA glycosylase (glyc), peptide-methionine (S)-S-oxide reductase (red), glutathione reductase (glut), 16 kDa heat shock protein B (hspB), molecular chaperone Hsp33 (Hsp33) у *E. coli* 866 в процессе формирования резистентности к комплексному препарату на основе цефотаксима и апрамицина (К-2)

Заключение. Таким образом, при изучении паттернов экспрессии генов ферментов репарации ДНК установлено, что в процессе формирования резистентности путем культивирования бактерий в МПБ, содержащем возрастающие суббактериостатические концентрации препаратов в течение 60 пассажей, происходит изменение представленности транскриптов генов ферментов репарации ДНК. В большей степени - при применении цефотоксима, апрамицина и комплексного препарата на основе цефотоксима и апрамицина в отношении белка теплового шока 16 кДа (hspB). Относительный уровень экспрессии белка теплового шока 16 кДа (hspB) при применении цефотаксима после 60-го пассажа составлял 248,99 раз, а при использовании апрамицина его уровень составлял 879,171 раз. При культивировании *E. coli* 866 в МПБ, содержащем возрастающие суббактериостатические концентрации комплексного препарата на основе цефотаксима и апрамицина, после 40-го пассажа отмечалось повышение относительного уровня экспрессии белка теплового шока 16 кДа (hspB) до 10085,535 раз, молекулярного шаперона - Hsp33 (Hsp33) до 60,547 раз.

Изменения генов ферментов репарации ДНК обуславливаются тем, что репарация ДНК является фундаментальным биологическим процессом, обеспечивающим стабильность и целостность генетической информации клетки. Особое внимание отводится ферментам, удаляющим повреждения ДНК, вызванным воздействием активного кислорода. Высокореакционноспособные гидроксильные радикалы и синглетный кислород способны вызывать делеционные дефекты в ДНК и приводить к летальным и мутагенным повреждениям. Целостность ДНК после таких модификаций чаще всего восстанавливается путем эксцизионной репарации оснований. Характерные изменения ферментов репарации ДНК, отмеченные при использовании комплексного препарата на основе цефотаксима и апрамицина, объясняются потенцированием действия компонентов комбинации и снижением процессов формирования антибактериорезистентности у изучаемого штамма *E. coli* 866.

Литература. 1. Устойчивость микроорганизмов к антибиотикам: резистомы, её объём, разнообразие и развитие / К. А. Виноградова, В. Г. Булгакова, А. Н. Полин, П. А. Кожевин // *Антибиотики и химиотерапия*. - 2013. - Т. 58, № 5-6. - С. 38-48. 2. Высоцкий, В. В. Поли (гетероморфные) формы бактерий в инфекционной патологии / В. В. Высоцкий, Г. А. Котлярова // *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии*. - 1999. - № 2. - С. 100-104. 3. Изыскание антибиотиков, эффективных в отношении бактерий с лекарственной устойчивостью на примере *Vacillus rutilus* -продуцента антибиотика амикумацина А / Т. А. // *Вестник ОГУ*. - № 13 (174). - 2014. - С. 27-31, 150-151. 4. Мартынова, Е. А. Микотоксин фумонизин В1 и регуляция микробиоценоза : монография / Е. А. Мартынова, О. Б. Иванченко. - Москва : Изд-во МЧС РФ, 2006. - 350 с. 5. Ильинский, Е. В. Острые расстройства пищеварения у новорожденных телят / Е. В. Ильинский, К. Г. Габриелян // *Ветеринария сельскохозяйственных животных*. - 2006. - № 1. - С. 67-68. 6. Андреева, А. В. Иммунобиологические изменения в организме телят под влиянием композиций фитопробióтиков и полисолей микроразделов / А. В. Андреева, О. Н. Николаева // *Достижения науки и техники АПК*. - 2008. - № 4. - С. 36-39. 7. Thiara, A. S. Interplay of novobiocin-resistant and -sensitive DNA gyrase activities in self-protection of the novobiocin producer, *Streptomyces sphaerooides* / A. S. Thiara, E. - *Gene*, 1989. - № 81 (1). - P. 65-72. 8. Nguyen, L. Foundations of antibiotic resistance in bacterial physiology: the mycobacterial paradigm / L. Nguyen, C. J. Thompson // *Trends Microbiol.* - 2006. - V. 14, № 7. - P. 304-312. 9. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ / В. П. Фисенко, Е. В. Арзамасцев, Э. Л. Бабаян [и др.]. - Москва : ЗАО «ИИА «Ремедиум». - 2000. - 397 с. 10. Birnboim, H. C. A rapid alkaline lysis procedure for screening recombinant plasmid DNA / H. C. Birnboim, J. Doly // *Nucleic Acids Res.* - 1979. - Vol. 7. - P. 1513-1522. 11. Chomczynski, P. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction / P. Chomczynski, N. Sacchi // *Anal. Biochem.* - 1987. - Vol. 162. - P. 156-159.

Статья передана в печать 04.09.2018 г.