АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ

ІНСТИТУТ МІКРОБІОЛОГІЇ ТА ВІРУСОЛОГІЇ ім. Д.К.ЗАБОЛОТНОГО

На правах рукопису

УДК 579.222.6 : 579.861.2:615.33

ОРЯБІНСЬКА Лариса Борисівна

СТРУКТУРНО-ФУНКЦІОНАЛЬНІ ЗМІНИ МЕМБРАН СТАФІЛОКОКІВ У ЗВ'ЯЗКУ ЗІ СТІЙКІСТЮ ДО АНТИБІОТИКІВ

03.00.07 - мікробіологія

А в т о р е ф е р а т

дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук

Київ - 1994

ЛННБ України ім.В.Стефаника
00801688 (V)
Ав 29.343

...мікробіології Дніпропетровського державного університету.

Науковий керівник: академік АН ВШ України, професор Вінніков Альберт Іванович.

Офіційні опоненти: доктор біологічних наук Соколов Іван Георгійович,

кандидат біологічних наук Назаренко Володимир Іванович.

Провідна установа: Інститут епідеміології і інфекційних захворювань ім. Громашевського.

Захист відбудеться "16" березня 1994 р. в _____ годин на засіданні спеціалізованої вченої ради Д0 I6.06.0I при Інституті мікробіології і вірусології ім. Заболотного АН України за адресою:

252627, ГСП, Київ-I43, вул. Заболотного, 26.

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці Інституту мікробіології і вірусології ім. Д.К.Заболотного АН України.

Автореферат розісланий "16" лютого 1994 р.

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради
кандидат біологічних наук

Пуріш Лариса Михайлівна

ЛНБ ім. В. Стефаника
АН України

АВ-29343

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність роботи. Неконтрольоване використання антибіотиків у медицині та ветеринарії привело до появи і швидкого розповсюдження стійких до них мікроорганізмів, серед яких особливу групу складають стафілококи.

Пластичність метаболізму стафілококів дозволяє їм пристосовуватися та виробляти засоби захисту одночасно до кількох антибіотиків, а також антисептиків та дезинфікуючих засобів (Lyon, Skurray , 1981). Це призводить до зниження ефективності лікування багатьох захворювань, що дозволяє розглядати стійкість до антибіотиків як одну з актуальних проблем сучасної мікробіології та клінічної медицини.

Виявлено, що виникнення стійкості до ліків у мікроорганізмів тісно пов'язане зі змінами їх обміну речовин. Незважаючи на те, що є достатня кількість публікацій з цієї проблеми, ряд питань, особливо в галузі молекулярних механізмів стійкості, лишаються до кінця не з'ясованими.

Для 80-90-х років властива підсилена увага до деяких нових аспектів антибіотикорезистентності з позиції визнання ролі кооперативних взаємодій всіх захисних систем в одній клітині (Навашин, 1990). В зв'язку з цим слід було чекати, що значна частина біохімічних процесів, що супроводжують антибіотикорезистентність, буде зосереджена в мембрані, з якою, як відомо, пов'язано багато важливих для життя функцій клітин мікроорганізмів.

Останнім часом мембрану розглядають і як найважливішу "мішень" дії антибактеріальних сполук, так як окрім враження конкретно-функціональної одиниці, антибіотики виявляють різноманітний вплив на бактеріальну клітину.

За відсутністю системних даних про роль мембрани, як одного з факторів, що обумовлюють антибіотикорезистентність, вивчення процесів, що протікають в ній при формуванні захисних механізмів та впливові антибактеріальних сполук можуть мати велике значення для пошуків раціональних методів боротьби з антибіотикостійкими штамами стафілококів.

Мета даної роботи. Виходячи з вищевикладеного, метою нашого дослідження стало порівняльне вивчення мембранного апарату клітин стафілококків за набуття ними стійкості до антибіотиків. Реалізація поставленої мети вимагала розв'язання таких задач:

- розробити нові ефективні методи дезінтеграції клітин стафіло-

кому та виділення внутрішньоклітинних структур в нативному стані;

- вивчити особливості функціонування мембранозв'язаних ферментів ланцюгу переносу електронів та трансформації енергії в клітинах чутливого та стійких до антибіотиків штамів стафілококу;

- визначити особливості хімічного складу мембран стафілококу у зв'язку зі стійкістю до антибіотиків;

- провести порівняльне дослідження впливу пеніциліну, тетрацикліну, еритроміцину та хлорамфеніколу на функціонування мембранозв'язаних ферментів системи енергозабезпечення клітин стафілококу.

Наукова новизна. Представлені прямі експериментальні докази участі мембранних структур у формуванні механізмів антибіотикорезистентності.

Вперше показано, що здобуття стійкості до цілого ряду антибіотиків у стафілококів пов'язано зі змінами функціонування ферментів дихального ланцюгу, хімічного складу та проникливості цитоплазматичної мембрани. Вказані зміни залежали від природи генетичних детермінант, кодуючих стійкість до антибіотиків.

Виявлено вплив антибіотиків, що пригнічують синтез білку та компонентів клітинної стінки, на проникливість мембран та функціонування ряду мембранозв'язаних ферментів.

Розроблено ефективний метод дезінтеграції клітин стафілококу з використанням ферментного препарату штаму Actinomyces recifensis. var. lyticus 2435 та запропоновані схеми одержання клітинних стінок та цитоплазматичних мембран клітин стафілококу.

Практична значимість роботи. Дані, одержані в роботі, дозволяють оцінити роль мембрани як об'єкту дії антибіотиків і як структури, з якою пов'язано ряд ланцюгів механізму стійкості до антибіотиків. Це треба враховувати при розробці методів раціональної антибіотикотерапії та пошукові нових хіміотерапевтичних препаратів, об'єктом дії яких можуть бути мембранні структури.

Розроблений метод дезінтеграції клітин з використанням ферментного препарату штаму Act. recifensis var.lyticus 2435 придатний для одержання інших внутрішньоклітинних утворень, включаючи генетичний матеріал клітин (Бабенко, Орябінська, 1990), що може знайти широке використання при вивченні біології стафілококів та їх генетики.

Препарати клітинних стінок та цитоплазматичних мембран виділені ферментативним методом, можуть бути використані для вивчення їх структурної організації та хімічного складу, а також бути моделлю при вивченні механізму дії ряду антибіотиків та ферментів.

На захист виносяться основні положення дисертаційної роботи:

- розробка методів виділення субклітинних структур з використанням ферментного препарату штаму Act. recifensis var. lyticus 2435;
- зміна активності пов'язаних з мембранами ферментів енергозабезпечення клітин стафілококу за набуття стійкості до антибіотиків;
- наявність змін цитохромного складу та зміни кінетичних властивостей термінальної оксидази та АТФ-гідролази в мембранах стійких штамів;
- генетично детерміновані зміни у білковому та ліпідному складі мембран клітин стафілококів;
- дія пеніциліну, тетрацикліну, хлорамфеніколу та еритроміцину на мембранний апарат клітин стафілококів.

Апробація роботи. Матеріали дисертаційної роботи представлялися на підсумкових наукових конференціях Дніпропетровського державного університету, на УП з'їзді Українського мікробіологічного товариства (Чернівці, 1989), на конференціях "Регуляція мікробного метаболізму" (Пущино, 1989), "Молоді вчені - біотехнології" (Москва, 1989), "Проблеми хіміотерапії бактеріальної інфекції" (Москва, 1991), на Міжнародному конгресі біохіміків (Ізраїль, 1991), на 21 з'їзді FEBS (Ірландія, 1992), на УІ з'їзді Українського біохімічного товариства (Київ, 1992), на Кейстонському симпозіумі з молекулярної та клітинної біології (США, 1992), а також на УШ з'їзді Українського мікробіологічного товариства (Одеса, 1993).

Публікації. Результати досліджень опубліковані в 14 роботах, 5 робіт подані до друку.

Структура та обсяг дисертаційної роботи. Дисертація викладена на 200 сторінках друкарського тексту і складається з вступу, огляду літератури (2 розділи), експериментальної частини (5 розділів), заключення та висновків. Дисертація ілюстрована 25 таблицями та 27 малюнками. Список використаної літератури містить 285 джерел вітчизняних та іноземних авторів.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Об'єктом досліджень було використано штам Staphylococcus aureus 209, а також ряд штамів стафілококів із музею культур НДІ епідеміології ім. Н.Ф.Гамалеї АМН Росії, з відомою молекулярно-біологічною характеристикою. Штам 8325-4 був вихідним для отримання авторами трансдуктантів, що несуть плазміди та фаги. Вирощування клітин стафілококу проводили на МПА при температурі 37° С протягом 18 годин (до

кінця логарифмічної фази росту).

При вивченні впливу антибіотиків на ферменти енергозабезпечення клітин вони вносились в живильне середовище в суббактеріостатичних концентраціях, що складають для тетрацикліну 0,06 мкг/мл, хлорамфеніколу - I,94 мкг/мл, еритроміцину та пеніциліну - 0,03 та 0,075 мкг/мл відповідно.

Вивчення процесів обміну проводили на фракціях мембранних везикул, одержаних при ультразвуковій дезінтеграції та ферментативному гідролізі. Ферментативний лізис здійснювали з використанням препарату штаму Act. recifensis var. lyticus 2435 при t° 37° С. Ультразвукову дезінтеграцію проводили на диспергаторі УЗДН вітчизняного виробництва та UD -II виробництва Польщі. Обробка ультразвуком проводилась протягом I5 хвилин, з інтервалом 30 сек. Фракцію мембранних везикул одержували за допомогою диференційного центрифугування озвученої суспензії при 22000 g протягом 60 хв. для осадження незруйнованих клітин та великих клітинних фрагментів, та при I44000 g протягом 70 хв. для осадження мембран.

Швидкість поглинання кисню мембранами бактерій визначали на полярографі LP -7 (Чехо-Словаччина) за допомогою закритого платинового електроду Кларка. Константи гальмування визначали в координатах Диксона (Vinogradov et al. , I980).

Активність мембранозв'язаних дегідрогеназ визначали за відновленням 2,6-дихлорфеноліндофенолу на Specord UV VIS (Німеччина) при 660 нм (Островський та інші, I968).

Диференційні спектри поглинання цитохромів реєстрували на спектрофотометрі "Beckman DU -8" (США). Цитохроми відновлювали дитонітом натрію. СО-спектри записували після пропускання СО протягом 30 сек через розчин цитохромів, відновлених дитонітом натрію (Лісенкова, Мохова, I964).

Нітраредуктазну активність оцінювали за накопиченням нітритіонів в культуральній рідині за методом Бузлакової (I972).

Активність мембранозв'язаної АТФази визначали за приростом неорганічного фосфору при гідролізі АТФ (Симакова та інші, I968).

Білок у фракціях мембран визначали за методом Лоурі (Lowry , I95I) та Greenberg (I982).

Розділення білків мембран клітин стафілококу проводили методом електрофорезу в поліакриламідному гелі в присутності додецилсульфату натрію за методом Veber та Osborn (I969) в модифікації O' Farrel (I975).

Обчислення показників подібності білкових спектрів проводили

за методом Sneath (1963). Коефіцієнти подібності представляли у вигляді симетричної відносно діагоналі матриці, яку піддавали числовому аналізу методом одинарного зв'язку (Малашенко та інші, 1980).

Інфрачервоні спектри сухих плівок мембран знімали на приладі Specord 75 IR . Віднесення смуг поглинання проводили за Белами (1963). Розрахунок проводили за оптичною густиною смуг поглинання сигналів Амід-I (1600 $см^{-1}$), складноефірного зв'язку у фосфоліпідах (1740 $см^{-1}$) і алкільних ланцюгів жирних кислот (2929 $см^{-1}$) (Островський, 1973). Екстракцію ліпідів здійснювали за методом Folch,Lees (1957). Денситометрування нейтральних ліпідів проводили на лазерному денситометрі KB Ultroscan XL (США).

Виявлення фосфатмістких ліпідів здійснювали методом Васьковського та Костецького (гл. Kates , 1972). Кількісний вміст фосфоліпідів у зразках визначали за методом Gerlach та Deutiche (1963).

Проникливість мембран клітин визначали за виходом низькомолекулярних сполук, які мають максимум поглинання при 260 нм.

Статистичну обробку результатів проводили за методом Сепетліева (1968).

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

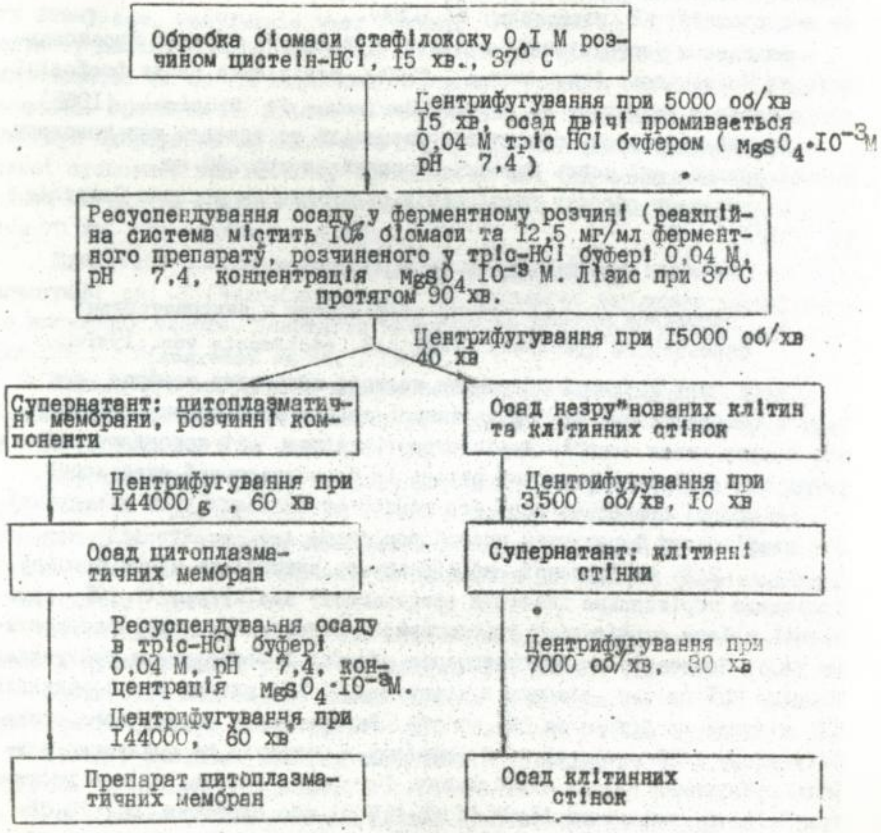
І. Одержання мембран клітин стафілококу з використанням ферментного препарату штаму Act. recifensis var. lyticus

Методичні труднощі одержання чистого препарату мембран, пов'язані з особливостями будови клітинної стінки стафілококу, потребують пошуку нових засобів дезінтеграції клітин, які дозволяють зберегти цілістність та високий рівень їх ферментативної активності.

В роботі приведені дані про підбір оптимальних умов лізису клітин стафілококу ферментним препаратом штаму Act. recifensis var. lyticus 2435 та факторах, що підвищують активність цього процесу. Проведено порівняльне вивчення ефективності дезінтеграції 10% суспензії клітин стафілококу ультразвуком, лізоцимом та препаратом штаму 2435. Показано, що ультразвукова обробка забезпечувала руйнування близько 68% клітин, лізоцим в концентрації 100 мкг/мл при 3-годинній дії лізував не більше як 16% клітин. Використання ферментного препарату штаму 2435 протягом цього періоду призводило до практично повного руйнування клітин стафілококу. Попередня обробка клітин протягом 5-15 хв. розчинами NaOH (0,05-0,5 М) або цистеїна-HCl (0,01-0,1 М) та SDS (0,01-0,02 М) сприяло підвищенню їх чутливості до ферментативного гідролізу в 2,6-4,7 рази та дозволило скоротити час лізису з 3-х годин до 5-15 хв. при температурі його проведення 55°С

і до 90 хв. при температурі 37° С.

На основі цих досліджень розроблені методи виділення фракцій цитоплазматичних мембран, що включають попередню обробку клітин, ферментативний гідроліз та диференційне центрифугування (мал. I). Розроблений метод ферментативної дезінтеграції клітин стафілококу на даному етапі дослідження може використовуватись також для отримання фракції клітинних стінок. Вихід клітинних стінок при підібраних нами умовах склав 8%. Цитоплазматичні мембрани зберігали активність мембранозв'язаних ферментів та високий рівень вмісту цитохромів (табл. I).



Мал. I. Схема виділення мембран та клітинних стінок із клітин стафілококу з використанням препарату штама 2435

Таблиця I

Питома активність систем енергетичного метаболізму та вмісту цитохромів в препаратах мембран S. aureus штама 209 Р

Метод руйнування	НАДН-оксидаза*	Дегідрогенази*			АТФ-аза**	Цитохроми, мкмоль/мг білку		
		малат	сукцинат	НАДН		в	а	с
Ультразвук	300,0 ±92,4	29,4 ±6,4	I2,2 ±2,3	I60,8 ±4I,4	I,8 ±0,2	0,46 ±0,09	0,I7 ±0,04	0,20 ±0,06
Ферментний препарат	220,0 ±38,6	6,I ±I,2	I2,0 ±2,5	I3I,I ±36,I	3,24 ±0,4	0,53 ±0,II	0,20 ±0,08	0,26 ±0,04

* нмолів субстрату за хв. на мг білку;

** мкмолів Pi на мг білку за годину.

Одержані дані свідчать про перспективність використання лізоензимного препарату штаму 2435 для дезінтеграції клітин стафілококу та виділення субклітинних структур. Ми гадаємо, що розроблені методи можуть бути з успіхом використані для одержання відомостей про субмікроскопічні зміни бактеріальних структур, які здійснюються під дією протимікробних сполук, а також в результаті формування захисних до них механізмів.

2. Активність мембранозв'язаних ферментів енергозабезпечення клітин стафілококу у зв'язку зі стійкістю до антибіотиків

Виходячи з поставленої перед нами задачі вияснення ролі мембранного апарату стафілококів в процесі розвитку антибіотикостійкості, була проведена оцінка систем енергетичного метаболізму за інтенсивністю швидкості окислення різних субстратів в мембранах чутливих та стійких до антибіотиків штамів стафілококів.

Ми намагалось з'ясувати, чи є взаємозв'язок між активністю дихальних ферментів зі стійкістю до антибіотиків та природою генетичних детермінант.

В роботі показано, що інтродукція плазмід резистентності в чутливий до антибіотиків штам стафілококу 8325-4 забезпечувала збільшення на I04-300% швидкості окислення субстратів НАДН, малату, сукцинату, інтенсифікацію механізму відновлення нітратів в I,II-I,40 разів і зниження активності деяких дегідрогеназ ЦТК (табл. 2). Можливо, що

Таблиця 2

Питома активність систем енергетичного метаболізму та вмісту цитохромів в препаратах мембран чутливого та стійких до антибіотиків штамів S. aureus

Штам	Стійкість до антибіотиків	Оксидази, нмолів O_2 за хв на мг білку			Дегідрогенази, нмолів субстрату за хв на мг білку			Цитохроми, нмолів на мг білку		
		НАДН	малат	сукцинат	НАДН	малат	сукцинат	в	а	о
8325-4	-	111,5±9	28,8±2	27,5±2	268,8±15	25,4±7	8,3±2	1,33±0,2	0,88±0,2	0,489±0,06
NLT-3	Tc	253,4±30	55,6±6	38,0±2	200,1±19	14,8±3	12,4±4	0,93±0,08	0,34±0,06	0,435±0,04
NLT-3(52A)Tc		245,0±10	68,8±7	40,0±2	181,5±24	20,1±5	4,0±1	0,87±0,06	0,15±0,04	0,399±0,04
NLC-3	C_m	334,2±22	58,3±3	41,3±3	134,1±28	15,7±2	4,2±1	1,07±0,09	0,23±0,07	0,489±0,08
NLC-3(52A)C_m		-	-	-	140,4±21	8,9±1	8,8±2	0,86±0,09	0,15±0,03	0,399±0,05
Ero 994	E_m	149,7±10	40,5±2	35,0±2	160,3±11	19,1±5	6,9±1	0,32±0,06	0,16±0,04	0,362±0,02
Ero 994(52A)E_m		-	-	-	164,8±29	18,1±4	6,3±1	0,26±0,09	0,10±0,02	0,344±0,03
Ept	E_m,Tc,P_n	167,3±20	31,6±1	31,8±1	145,6±41	6,7±1	5,1±1	0,67±0,10	0,31±0,06	0,507±0,07
Ept (52A)	E_m,Tc,P_n	152,6±11	34,0±2	-	134,5±12	19,6±3	5,1±1	0,62±0,12	0,17±0,03	0,344±0,03
PuB 101	P_n	160,5±16	40,0±2	28,8±1	84,4±12	23,5±5	10,3±2	1,10±0,2	0,33±0,08	0,435±0,05

Tc – тетрациклін, C_m – хлорамфенікол, E_m – еритроміцин, P_n – пеніцилін.

виявлені зміни активності дихальних систем мають біологічний зміст з точки зору забезпечення функціонування клітин в присутності високих концентрацій антибіотиків.

Проведений кінетичний аналіз впливу ціаніду калію на активність НАДН-оксидазної системи мембран дозволив виявити зміни на рівні термінальної оксидази за набуттям стійкості стафілококу до антибіотиків. Зменшення констант гальмування активності окислення НАДН в 1,4-2,4 рази мембранами стійких штамів можна пояснити підвищенням у них концентрації відновленої форми цитохромоксидази, яка зв'язує інгібітор (Kaufman , Gelder , 1974).

Для оцінки ролі різних компонентів електронтранспортної системи як складової частини механізму стійкості до антибіотиків було проведено порівняльне вивчення якісного складу та кількісного вмісту цитохромів в препаратах мембран, чутливих та стійких штамів.

Реєстрація диференційних (відновлених дитионітом проти окисленого повітрям) спектрів поглинання світу дозволила виявити в мембранах всіх досліджуваних штамів цитохроми а і в. Диференційні спектри комплексу з СО виявили присутність цитохрому о. Інтродукція генетичних детермінант в клітині чутливого штаму забезпечувала зсув диференційних максимумів поглинання для цитохромів в і о та приводила до зниження питомого вмісту цитохромів а і в (табл. 2). Зміни спектральних характеристик мембран свідчать про наявність якісно інших цитохромних компонентів або про зміни у співвідношенні цитохромних компонентів, що існують в мембранах батьківського штаму.

Відомо, що в результаті функціонування дихального ланцюгу у клітинах утворюється АТФ та інші макроергічні сполуки. З метою оцінки інтенсивності синтезу АТФ нами була визначена АТФ-фосфогідролазна активність мембран стафілококів у зв'язку зі стійкістю до антибіотиків.

Проведені дослідження показали, що мембрани стафілококів незалежно від штамової належності мали АТФазну активність, оптимальні умови дії якої проявлялись при pH 6,5 і температурі 45° С. Одновалентні катіони K^+ та Na^+ не стимулювали активність ферменту, як це було показано для клітин інших мікроорганізмів (Kubak, Yotis , 1981). Аналогічно впливали іони Ca^{2+}. Разом з тим, іони Mg^{2+}, внесені в середовище для інкубації в концентрації 4 мМ, викликали 3,1-3,8-кратну стимуляцію АТФазної активності. Ефект Mg^{2+} можна співвіднести з його здатністю утворювати хелатний комплекс з АТФ, який є істинним субстратом для бактеріальних АТФаз (Ota , Morishita , 1986).

Зв'язана з мембраною АТФаза усіх досліджуваних штамів проявляла чутливість до інгібіторів NaF, азіду натрію і N,N_I-дициклогексілкарбодиміду (ДЦКД), що є специфічним інгібітором протонних АТФаз.

Незважаючи на подібність у відношенні ряду кінетичних параметрів АТФазної реакції, мембрани чутливого штаму відрізнялись від мембран стійких до антибіотиків клітин стафілококу. Інтенсифікація швидкості гідролізу АТФ мембранами стійких клітин у I,3-2,5 рази, а також збільшення чутливості ферменту до ДЦКД у I,04-2,25 рази могли свідчити про більшу інтенсивність енергетичного метаболізму у зв'язку з виникненням стійкості до антибіотиків.

Приведені дані свідчать про те, що набуття клітинами стійкості до антибіотиків внаслідок інтродукції плазмід резистентності пов'язане зі зміною комплексу функціональних властивостей, що співпряжені з процесами енергозабезпечення клітин. Характер цих змін визначався природою генетичних детермінант. Показано, що штами стафілококів, лізогені за фагом 52А, відрізнялися від їх плазмідних варіантів. Трансдукція фагу 52А забезпечувала зниження рівню активності НАДН-оксидазної системи, нітраредуктази та АТФази, що могло свідчити про вплив цього генетичного фактору на метаболічні процеси клітини.

3. Особливості складу мембран чутливого та стійких до антибіотиків штамів стафілококів

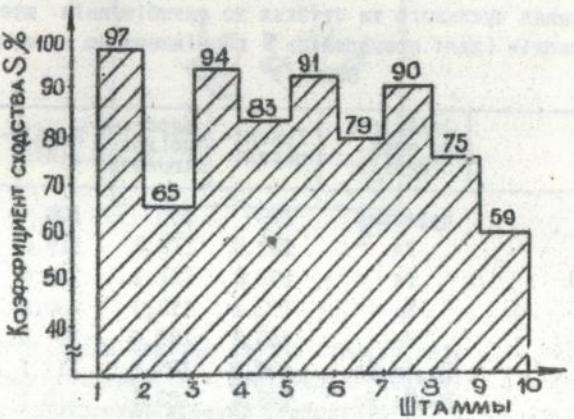
Аналіз кореляції між ступенем змін функціонування зв'язаних з мембранами ферментів та природою резистентності дозволив допустити, що мембранні структури, втягнені в систему реалізації генетичної інформації, що міститься в генах антибіотикорезистентності.

У зв'язку з цим, провідним напрямком подальших досліджень стало порівняльне вивчення хімічного складу мембран чутливого та стійких до антибіотиків штамів стафілококів.

Проведені дослідження показали, что білки мембран усіх досліджуваних штамів при електрофорезі з додецилсульфатом натрію розподілялись на фракції з молекулярними масами від IO до I70 КД, що відповідає літературним даним для мембранних білків інших штамів стафілококів (Григорьева, Лукоянова, I98I). Набуття стійкості супроводжувалось збільшенням білкових фракцій від 26 до 35 компонентів. Індивідуальність білкових спектрів мембран підтверджувала наявність нових білків, пов'язаних з реалізацією резистентності чи втратою здатності клітин до синтезу ряду білків, які є у батьківського штама.

Серед досліджених культур більшою подібністю білкових спектрів характеризувались штами, які несли плазміди стійкості до антибіотиків та їх трансдуктанти по фагу 52А.

Денситометрування електрофореграм білків та розраховані показники подібності дозволили нам провести групування досліджених культур за ступенем подібності їх білкових спектрів і одержані результати подати у вигляді стовпчатої діаграми, розрахованої за методом одинарного зв'язку (мал. 2). На діаграмі ломана лінія, що поєднує досліджені штами, являє собою найкоротший зв'язок між ними при найвищих коефіцієнтах подібності.



Мал. 2. Діаграма, що відображає подібність білкових спектрів різних штамів стафілококів: I - Ero 994, 2 - Ero 994 (52A), 3 - NLC-3, 4 - NLC-3 (52A), 5 - NLT-3 (52A), 6- NLT-3, 7 - Ept , 8 - Ept (52A), 9 - PUBIOI, IO - 8325-4

Вивчення ліпідного складу мембран дозволило виявити особливості ліпогенезу клітин стафілококу у зв'язку зі стійкістю до антибіотиків. Проведені дослідження показали присутність у мембранах усіх досліджуваних штамів стафілококів двох класів сполук - нейтральних ліпідів та фосфоліпідів. Фракційний склад нейтральних ліпідів був представлений моно- і дигліцеридами, фракцією вільних жирних кислот, тригліцеридами, також виявлені каротиноїди та дві неідентифіковані фракції.

Показана закономірність збільшення в мембранах стійких штамів

фракцій тригліцеридів та каротиноїдних пігментів (табл. 3), що, можливо, мало великий біологічний зміст. Виявлене переважання тригліцеридів могло свідчити про збільшення частки нейтральних ліпідів, які лежать в основі обміну фосфоліпідів, а також виконуючих роль запасних енергетичних речовин. Збільшення вмісту каротиноїдних пігментів можна розглядати як непряме підтвердження збагачення мембран менахінонами, які за даними Hammond, White (I970) виявлялись у фракціях каротиноїдних пігментів.

Таблиця 3

Вміст окремих фракцій ліпідів та каротиноїдних пігментів в мембранах чутливого та стійких до антибіотиків штамів стафілококів (дані приведені в % по відношенню до штаму 8325-4)

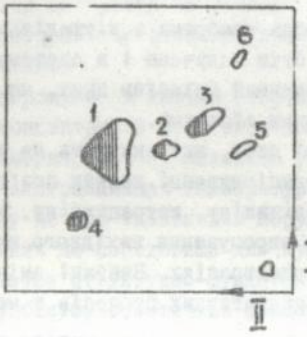
Штам	Стійкість до антибіотиків	Тригліцериди	Каротиноїдні пігменти	Кардіоліпін	Фосфатидна кислота
8325-4	чутливий	I00	I00	I00	I00
N_{LT}-3	Tc	I28,8	II9,8	II9,0	I69,6
N_{LT}-3 (52A)	Tc	I0I,8	I0I,I	II3,0	32I,7
Erc 994	Em	I72,I	I72,5	I30,0	I69,6
Erc 994 (52A)	Em	I35,I	I39,6	I2I,0	304,0
Ept	Em,Tc,Pn	I27,9	I27,5	II7,I	I43,5
Ept (52A)	Em,Tc,Pn	I05,4	I23,I	II5,I	252,0
PvB I0I	Pn	I49,5	I69,2	I20,0	I52,0
N_{IC}-3	Cm	I33,3	202,0	-	-
N_{IC}-3 (52A)	Cm	II5,3	I03,3	-	-

"-" не визначали.

Вивчення складу фосфоліпідів дозволило встановити, що за складом основних фракцій фосфоліпідів резистентні клітини, які містили плазміди стійкості, не відрізнялись від чутливого до антибіотиків штаму стафілококів і включали кардіоліпін, фосфатидилгліцерин, фосфатидилетаноламін, фосфатидну кислоту та неідентифікований фосфоліпід $У_I$. Дезорганізація плазмідних штамів фагом 52A корелювала з включенням до складу мембранних ліпідів неідентифікованого фосфоліпіду $У_2$ і одночасною втратою здатності до синтезу фосфоліпіда $У_I$ (мал. 3).

Розвиток стійкості до антибіотиків супроводжувався перерозподілом окремих фракцій фосфоліпідів у бік збільшення вмісту кардіоліпі-

ну та фосфатидної кислоти (табл. 3). Не виключено, що перерозподіл у складі фосфоліпідів може обумовлюватися високою метаболічною активністю цих сполук та їх можливими взаємоперетвореннями.



Мал. 3. Фосфоліпіди мембран клітин стафілококів: I – кардіоліпін, 2 – фосфатидилгліцерин, 3 – фосфатидилетаноламін, 4 – фосфатидна кислота, 5 – неідентифікований фосфоліпід $У_1$, 6 – неідентифікований фосфоліпід $У_2$

Аналізуючи літературні дані (Белоусова, 1980), ми припустили, що розвиток стійкості до антибіотиків може супроводжуватись інтенсифікацією метаболічних шляхів, які відповідають за біосинтез ліпідів. Аналіз ІЧ-спектрів показав зростання відношення ліпіда до білка у клітинах стійких до антибіотиків штамів у I,I2-I,72 рази, що підтвердило наше припущення.

Відповідно до одержаних нами даних доцільно було припустити, що зміни в ліпідному складі могли б сприяти виникненню стійкості клітин стафілококу до високих концентрацій антибіотичних речовин внаслідок зміни функціональної лабільності мембран.

Проведені дослідження показали, що інтенсифікація ліпідоутворення та перерозподіл у білково-ліпідному комплексі приводили до підвищення функціональної лабільності мембран стійких клітин, про що свідчило збільшення їх клітинної проникності у I,4-3,0 рази для продуктів нуклеотидної природи під впливом екстремальних температур та різних значень pH середовища.

Таким чином, виявлені нами особливості метаболізму клітин стафілококу дозволяють припустити, що один з механізмів антибіотикорезистентності обумовлений модифікацією ліпідного та білкового складу мембран, що вказує на значні перебудови мембранного апарату клітин стафілококу при реалізації механізмів стійкості до антибіотиків.

4. Деякі аспекти механізму дії ряду антистафілококових антибіотиків

Враховуючи важливу роль мембрани в життєдіяльності клітини, ми припустили, що вона може бути залучена і в систему дії ряду антибактеріальних сполучень, первинний механізм яких, як вважалось, не зв'язаний з мембранотропними ефектами.

В таблиці 4 приведені дані, які вказують на зміни в кількісному вмісті цитохромів та у функціонуванні деяких пов'язаних з мембранами ферментів при внесенні пеніциліну, тетрацикліну, хлорамфеніколу та еритроміцину в середовище вирощування вихідного штаму стафілококів в суббактеріостатичних концентраціях. Вказані зміни, вірогідно, слід віднести до порушення біосинтетичних процесів в метаболізмі деяких мембранних білків.

Таблиця 4

Питома активність систем енергетичного метаболізму та вмісту цитохромів в препаратах мембран S. aureus штама 8325-4, вирощених в присутності антибіотиків (дані приведені в % по відношенню до вихідного штаму)

Антибіотик	Концентрація антибіотика	НАДН-оксидаза	Дегідрогенази			Цитохроми			АТФаза
			НАДН	сукцинат	малат	а	в	с	
-	-	I00	I00	I00	I00	I00	I00	I00	I00
Пеніцилін	0,0075	68,3	43,8	I00	I72,4	7I,5	50,8	62,3	68,6
Еритроміцин	0,03	84,6	85,6	4I,5	II,0	62,2	23,8	24,6	90,7
Тетрациклін	0,06	89,6	5I,9	92,7	38,2	I3I,7	I30,2	54,I	70,6
Хлорамфенікол	I,94	84,9	55,6	I84,I	I76,0	I34,I	79,4	86,9	29,7

Поряд з тим внесення антибіотиків в реакційну систему, яка містить мембрани клітин, що виросли у відсутності антибіотиків, також дозволило виявити пригнічення активностей ферментів НАДН-оксидази і АТФази на 85,4-87,5%. Очевидно, що одержаний ефект не був пов'язаний з репресією синтезу ферментів, а мав характер швидкої реакції на вве-

дений в систему антибіотик.

Ми припустили, що ці зміни можуть бути обумовлені порушенням конформаційного стану мембран при адсорбції на ній антибіотичних речовин. Але зміна проникності клітин для низькомолекулярних сполук нуклеотидної природи відмічена тільки для тетрацикліну та хлорамфеніколу. Відсутність деструктивних змін мембран під дією пеніциліну та еритроміцину могла вказувати на різницю у ступеню зв'язування їх з поверхневими структурами та свідчити про інші механізми проникнення до мікробної клітини.

Разом з тим, вирощування клітин стафілококу в присутності суббактеріостатичних концентрацій усіх досліджених антибіотиків приводило до порушень мембран, які проявлялися у різкій зміні проникності клітин під дією екстремальних температур. Характер порушень мембран у цьому випадку не був ідентичним порушенню мембран при дії антибіотиків, внесених до середовища для культурування клітин in vitro. Можливо, зміна структурно-функціонального стану мембран є наслідком впливу суббактеріостатичних концентрацій антибіотиків на метаболічні процеси клітин.

Проведені дослідження можуть свідчити про те, що мембрана включена в систему первинного механізму дії досліджених антибіотиків, що необхідно враховувати при їх рекомендації в клініці.

ВИСНОВКИ

I. Розроблені методи виділення препаратів клітинних стінок та функціонально активних фракцій цитоплазматичних мембран стафілококів, які включають попередню обробку клітин 0,I М розчином цистеїну-HCl, наступний гідроліз з використанням ферментного препарату штаму Act. recifensis var. lyticus 2435 і диференційне центрифугування.

2. Реалізація механізмів антибіотикорезистентності супроводжувалась зниженням швидкості дегідрування субстратів ЦТК, збільшенням оксидазних і нітратредуктазної активностей та підвищенням чутливості НАДН-оксидазної системи до інгібітора KCN, що вказувало на зміни в енергетичному метаболізмі штамів S. aureus, які містять плазміди стійкості до пеніциліну, тетрацикліну, хлорамфеніколу і еритроміцину.

3. В дихальному ланцюгу всіх досліджених штамів S. aureus виявлено цитохроми а, в і с. Набуття стійкості супроводжувалось зниженням питомого вмісту цитохромів а і в та зміною спектральних характеристик цитохромів в і с.

4. Встановлено, що АТФаза всіх досліджених штамів S. aureus а-

Mg-залежним ферментом, чутливим до інгібіторів NaF, азиду натрію та ДЦКД, з оптимумом дії при pH 6,5 та температурі 45° С. Набуття стійкості до антибіотиків приводило до підвищення АТФ-гідролазної активності мембранних препаратів в I,8-2,5 рази та пропорціонального збільшення чутливості фермента до інгібітора ДЦКД.

5. Інтродукція плазмід резистентності і генома фагу 52А в клітини чутливого штаму S. aureus забезпечувала зміну білкового профілю мембран, підвищення в I,I2-I,72 рази відносної частки мембранних ліпідів та перерозподіл їх вмісту в бік збільшення кардіоліпіну, фосфатидної кислоти, тригліцеридів та каротиноїдних пігментів.

6. Стійкість до антибіотиків штамів S. aureus корелювала зі зміною осмотичної стабільності мембран, на що вказувало підвищення в I,4-3,0 рази їх проникливості для низькомолекулярних сполук нуклеотидної природи під дією різних температур та значень pH середовища.

7. Показано, що суббактеріостатичні концентрації пеніцилліну, тетрацикліну, хлорамфеніколу та еритроміцину впливають на активність ферментів електронтранспортного ланцюга і АТФази, а також на мембранну проникливість, що свідчить про залучення мембранних структур чутливого штаму стафілокок'в до системи дії вказаних антибіотиків.

ПРАЦІ, ОПУБЛІКОВАНІ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

I. Бабенко Ю.С., Орябинская Л.Б. Ферментный лизис клеток стафилококка и получение клеточных стенок // Антибиотики и химиотерапия, - I988. - Т. XXXIII, № 2. - С. III-II5.

2. Орябинская Л.Б., Винников А.И. Активность фермента энергетического обмена в клетках стафилококков, чувствительных и устойчивых к антибиотикам // В сб.: Всесоюзн. конф. "Регуляция микробного метаболизма", Пущино. Тез. докл. - I989. - С. I87.

3. Орябинская Л.Б., Гаврилюк В.Г., Винников А.И. АТФазная активность стафилококков в связи с устойчивостью к антибиотикам // В сб.: УП съезд УМО: Тез. докл., Черновцы. - I989.

4. Орябинская Л.Б., Бабенко Ю.С., Винников А.И. Изучение возможности использования нового препарата литических ферментов в аналитических целях // В сб.: Всесоюзн. конф. "Регуляция микробного метаболизма". Тез. докл. Пущино. - I989. - С. 56.

5. Кукушкина Н.В., Черногор Н.П., Котелевец Л.М., Орябинская Л.Б. Применение лизоэкзинного комплекса 248 для разрушения бактериальных клеток // Сб. тез. докл. Всесоюзн. конф. "Молодые ученые - биотехнологии", Москва. - I989. - С. 4-5.

6. Орябинская Л.Б., Бабенко Ю.С., Винников А.И. Использование ферментного препарата штамма Act. recifensis var. lyticus 2435 для выделения мембранных препаратов из клеток стафилококка // Антибиотики и химиотерапия. - 1990. - Т. 35, № 6. - С. 18-21.
7. Бабенко Ю.С., Орябинская Л.Б. Применение лизоэнзимного препарата Act. recifensis var. lyticus 2435 для выделения ДНК из клеток стафилококка // Антибиотики и химиотерапия. - 1990, № 3. - С. 17-20.
8. Орябинская Л.Б., Голодок Л.П., Винников А.И. Активность мембраносвязанных ферментов стафилококков, содержащих плазмиды устойчивости к ряду антибиотиков // Тез. Всесоюзн. конф. "Проблемы химиотерапии бактериальной инфекции", Москва. - 1991. - С. 480-481.
9. Орябинская Л.Б., Винников А.И., Голодок Л.П. Особенности энергетического обмена стафилококков, содержащих плазмиды устойчивости к ряду антибиотиков // Антибиотики и химиотерапия. - 1992. - Т. 37, № 10. - С. 34-37.
10. Голодок Л.П., Вінніков А.І., Орябінська Л.Б. Зміна структурно-функціональних параметрів мембранних компонентів чутливих і стійких до антибіотиків стафілококів // Укр. біохім. з'їзд, Київ, Видавництво УСТА. - 1992. - Ч. І. - С. 68.
11. Орябінська Л.Б., Голодок Л.П., Вінніков А.І. Деякі властивості мембраносв'язаної АТФази чутливих і стійких до антибіотиків штамів стафілокока // Укр. біохім. з'їзд, Київ, Видавництво УСТА. - 1992. - Ч. 3. - С. 84.
12. Vinnikov A.I., Oryabinskaya L.B., Golodok L.B. Characteristic features of energy metabolism in Staphylococci containing plasmids of resistance to some antibiotics. Israel. 1991
13. Vinnikov A.I., Golodok L.P., Oryabinskaya L.B., Cherevach N.V. The membraneconnected ATPase of antibiotics resistance staphylococcal strains // 21st FEBS Meeting, August 9-14.- Ireland, Bublin 2.- 1992
14. Oryabinskay L.B., Vinnikov A.I., Ruban O.V. Genetic determinants of the membrane-bound ATPase of Staphylococci // Keystone Symposia on Molecular and Cellular Biology.- J. of Cellular biochemistry.- 1993.

ЛНВ ім. В. Стефаника
АН України

АВ 29.343

тип. ДГУ зак. 51 тир. 100