УДК 615. 281 [6:539] – 022.532 Оригинальная статья

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ЭКСТРАКТА ЧИСТОТЕЛА БОЛЬШОГО С ПЛАЗМИДНОЙ ДНК, ВЫДЕЛЕННОЙ ИЗ КЛИНИЧЕСКОГО ШТАММА ESHERICHIA COLI

И.В. Бабушкина *– ФГУ СарНИИТО Росмедтехнологий, старший научный сотрудник отдела лабораторной и функциональной диагностики, кандидат медицинских наук;* ***А.А. Свистунов*** *– ГОУ ВПО Саратовский ГМУ им. В.И. Разумовского Росздрава, первый проректор, заведующий кафедрой общей и клинической фармакологии, доктор медицинских наук, профессор;* ***Х.-М.П. Чомаев*** *– ГОУ ВПО Саратовский ГМУ им. В.И. Разумовского Росздрава, аспирант кафедры биологической химии;* ***Е.Г. Чеботарева*** *– ГОУ ВПО Саратовский ГМУ им. В.И. Разумовского Росздрава, ассистент кафедры биологической химии, кандидат медицинских наук;* ***Н.А. Бельская*** *– ГОУ ВПО Саратовский ГМУ им. В.И. Разумовского Росздрава, доцент кафедры биологической химии, кандидат медицинских наук.*

INTERACTION OF GREATER CELANDINE EXTRACT AND PLASMID DNA EXCRETED OF ESCHERICHIA COLI CLINICAL CULTURE

I.V. Babushkina *– Saratov Scientific Research Institute of Traumatology and Orthopedics, Department of Laboratory and Functional Diagnostics, Chief Research Assistant, Candidate of Medical Science;* ***A.A. Svistunov*** *– Saratov State Medical University, First Pro-rector, Head of Department of Pharmacology and Clinical Pharmacology, Professor, Doctor of Medical Science;* ***H.-M.P. Chomaev****– Saratov State Medical University; Department of Biochemistry, Post-graduate;* ***E.G. Chebotarjova*** *– Saratov State Medical University, Department of Biochemistry, Assistant, Candidate of Medical Science;* ***N.A. Belskaya*** *– Saratov State Medical University; Department of Biochemistry, Assistant Professor, Candidate of Medical Science.*

Дата поступления – 21.05.09 г. Дата принятия в печать – 26.06.09 г.

И.В. Бабушкина, А.А. Свистунов, Х.-М.П. Чомаев и соавт. **Взаимодействие экстракта чистотела большого с плазмидной ДНК, выделенной из клинического штамма Esherichia Coli. Саратовский научно-медицинский журнал, 2009, том 5, № 3, с. 310-312.**

Поиск соединений, обладающих антибактериальной активностью и влияющих на плазмидную ДНК, — одна из важных задач практической медицины. Природные вещества являются наиболее желательными кандидатами на эту роль.

Выделение плазмидной ДНК проводили из штамма Esherichia coli, полученного от больного Н., страдающего хроническим пиелонефритом, в бактериологической лаборатории Областной клинической больницы г. Саратова по модифицированному методу Birnboim и Doli. Производили подсчет концентрации алкалоидов (сангвинарина и хелеретрина), содержащихся в экстракте чистотела.

Разработанная методика была апробирована на пяти образцах настойки чистотела, заложенных на хранение для изучения стабильности содержания алкалоидов и других показателей качества данного препарата, при этом содержание суммы алкалоидов в настойке составляло 1%. Обнаружено уменьшение концентрации плазмидной ДНК после обработки клеток экстрактом чистотела.

Ключевые слова: экстракт чистотела, плазмидная ДНК, Esherichia coli.

I.V. Babushkina., A.A. Svistunov, H.-M.P. Chomaev et al. **Interaction of Big Celandine Extract and Plasmid DNA, Excreted From the Clinical Strain Escherichia Coli. Saratov Journal of Medical Scientific Research, 2009, vol. 5, № 3, p. 310-312.**

Search for compounds which possess antibacterial activity and have an effect on plasmid DNA, is one more of the important problems of applied medicine. Natural substances are the most desirable candidates for this role.

Plasmid DNA excretion was carried out from the strain Echerihiacoli, derived from patient N., who suffered from chronic pyelonephritis, in the bacteriological laboratory of the Regional clinical hospital of Saratov according to the modified method Birnboim and Doli. The calculation of alkaloid concentration was made, e.g. Sanguinarin and Cheleretrin contained in celandine extract.

The devised method has been tested on five celandine tincture samples, stored for the research of the stability of the content of alkaloids and other quality factors of the given preparation. In so doing the content of the alkaloid sum in tincture changes within the limits of 1 %. Abatement of plasmid DNA concentration after the cell treatment by celandine extract is revealed.

Key words: celandine extract, plasmid DNA, Esherichia coli.

Введение. Госпитальные инфекции остаются одной из основных проблем медицины в настоящее время. Плазмидные ДНК бактериальных клеток являются главным генетическим маркером антибиотикоустойчивости микроорганизмов [1]. Выделение плазмидных ДНК из бактериальных клеток, как правило, осуществляется согласно хорошо апробированным методикам, которые были разработаны для эталонных штаммов микроорганизмов и с успехом применяются в различных областях молекулярной биологии [2]. В качестве эталонных штаммов, в основном, используются штаммы *Escherichia coli:* HB101, K-12, C-600 и другие. Спектр грамотрицательных микроорганизмов, которые обнаруживаются при посеве на среды от больных, находящихся на лечении в стационаре, достаточно обширен и включает в себя такие бактериальные штаммы, как: *Pseudomonas aeruginosa, Serratia plymuthica, Klebsiella, Proteus vulgaris, E.coli, Citrobacter* [3].

Естественно предположить, что строение клеточной стенки у таких штаммов, а также их метаболизм будут существенно различаться. Подбор условий для оптимального роста и последующего лизиса клеток представляет собой отдельную задачу, решение которой можно ожидать на пути последовательного эмпирического перебора наиболее доступных методов выращивания и лизирования клеточной биомассы.

Ответственный автор – **Бабушкина Ирина Владимировна**,
410002 г. Саратов, ул. Чернышевского, 148,
тел. 89272233881.
E-mail: sarniito-lab@yandex.ru

Поиск соединений, обладающих антибактериальной активностью, — еще одна важная задача практической медицины. Природные вещества являются наиболее желательными кандидатами на эту роль.

Материалы и методы. Для исследований использовали сбор чистотела большого, произрастающего в районе Кумысной поляны города Саратова. Сбор проводили в начале цветения (май), так как именно в этот период количественный и качественный состав алкалоидов является оптимальным [4]. Собранные растения подвергали естественной сушке в тени. Отделяли листья и измельчали в фарфоровой ступке. Для получения водного экстракта навеску растительного материала массой 1г заливали 10мл дистиллированной воды. Экстракцию осуществляли в течение 15 минут при температуре 80єС. Методика количественного определения суммы алкалоидов в настойке чистотела следующая. 20 мл настойки чистотела помещают в круглодонную колбу вместимостью 100 мл и упаривают под вакуумом на ротационном испарителе до 1/4 исходного объема. Полученный остаток количественно переносят в делительную воронку вместимостью 50-100 мл, прибавляют 8 мл 25%-ного раствора аммиака и алкалоиды трижды извлекают хлороформом (порциями по 20, 20 и 10 мл соответственно). Объединенные хлороформные извлечения дважды обрабатывают 5%-ным раствором серной кислоты в делительной воронке вместимостью 50–100 мл порциями по 20 мл. К объединенным сернокислым извлечениям прибавляют 8 мл 25%-ного раствора аммиака и основания алкалоидов вновь трижды экстрагируют хлороформом в делительной воронке вместимостью 50-100 мл порциями по 20, 20 и 10 мл соответственно. Объединенные хлороформные извлечения переносят в круглодонную колбу вместимостью 100 и 250 мл и отгоняют хлороформ досуха под вакуумом.

Сухой остаток количественно переносят в стакан для титрирования последовательно с помощью 5 мл ледяной уксусной кислоты, 10 мл ацетонитрила и титруют потенциометрически раствором хлорной кислоты (0.05 моль/л). Параллельно проводят контрольный опыт.

Массовую долю X (в %) суммы алкалоидов в пересчете на сангвинарин и хелеретрин в препарате вычисляют по формуле

$$X = \frac{(V - V1) * 0,01765 * 100}{40},$$

где 0,01765 – количество суммы алкалоидов в пересчете на сангвинарин и хелеретрин, соответствующее 1 мл раствора хлорной кислоты (0.05 моль/л), г, V – объем хлорной кислоты (0.05 моль/л), пошедшей на титрирование суммы алкалоидов, мл; V_1 – объем хлорной кислоты (0.05 моль/л), пошедшей на титрирование в контрольном опыте, мл.

Разработанная методика была апробирована на пяти образцах настойки чистотела, заложенных на хранение для изучения стабильности содержания алкалоидов и других показателей качества данного препаратах [5, 6]. При этом содержание суммы алкалоидов в настойке колеблется в пределах 1%.

Подсчет концентрации алкалоидов (по всей вероятности, сангвинарина и хелеретрина), содержащихся в экстракте чистотела, производили следующим образом. Поскольку навеска составляла один грамм, а количество алкалоидов 1%, то рассчитывали количество алкалоидов в 1 г сырья чистотела большого:

1 г – 100 %

х г – 1 %

х = 1Ч1/100 = 10^{-2} г

Известно, что молекулярная масса сангвинарина составляет 353 г/М, а молекулярная масса хелеретрина равна 367 г/М. Таким образом можно рассчитать концентрацию алкалоидов в 10 мл растворителя (исходный объем растворителя для экстракта чистотела большого). Усредним молекулярные массы сангвинарина и хелеретрина: (353 + 367)/2 = 360 г/М.

$$C_M = \frac{m}{M} \times \frac{1}{V_0},$$

где C_M – концентрация алкалоидов в М/л, m – масса алкалоида в г, М – молекулярная масса алкалоидов в г/М, V_0 – объем используемого растворителя в л.

$$C_M = \frac{10^{-2} г}{360 г / M} \times \frac{1}{10^{-2} л} \approx 2,8 \times 10^{-3} M / л,$$

Такая концентрация алкалоидов обнаруживается в 10 мл раствора, приготовленного описным выше методом.

Выделение плазмидных ДНК

Определение антибактериального действия соединений чистотела на бактериальные клетки штамма E. coli, выделенного от больного Н., страдающего хроническим пиелонефритом, проводили в бактериологической лаборатории Областной клинической больницы г. Саратова.

В большинстве методов выделения плазмидных ДНК используют биомассу, полученную в результате выращивания бактерий в течение 18 часов в 1-1,5 мл среды при температуре 37°С.

Больший объем культуральной среды нежелателен, так как препарат геномной ДНК будет слишком концентрированным и с таким препаратом трудно производить последующие действия.

Для быстрого выделения плазмид используют клетки, которые берут непосредственно с чашки с агаром. Трудность состоит в том, что при соскобе надо избегать захвата агара (он будет мешать при последующий работе), поскольку ингибирует активность большинства рестриктирующих эндонуклеаз и других ферментов, работающих на ДНК; этим ингибитором, возможно, являются содержащиеся в агаре сульфонированные углеводороды. Размер соскоба не должен превышать 2-х рисовых зерен, чтобы после ресуспендирования клеток их концентрация в растворе не превышала нужную.

Важным фактором является время выращивания культур. Оно не должно превышать 16–18 часов. При таком времени рост культур еще находится в логарифмической фазе, что дает большой выход плазмидной ДНК.

Лизис биомассы, как правило, является первым этапом многих методов выделения плазмид. Для разрушения клеточной стенки биомассу обрабатывают ЭДТА и лизоцимом. Под действием ЭДТА разрушается наружная мембрана, а лизоцим расщепляет мукопептидный слой.

Культуры микроорганизмов выращивали в 5 мл 10% питательной среды на основе бульона Хоттингера в течение 18 часов в термостате при температуре 37 °С.

Затем 1 мл бульонной культуры отбирали в микропробирки и концентрировали микробные клетки центрифугированием при 14000 об/мин в течение 1 минуты. Осадок ресуспендировали в 100 мкл раствора № 1, содержащего лизоцим “Serva” (2 мг/мл)

оставляли в ледяной бане на 10 минут. Лизоцим растворяли в растворе № 1 непосредственно перед использованием.

По истечении 10 минут к смеси добавляли 200 мкл раствора № 2. Микропробирки один раз резко встряхивали и снова помещали в ледяную баню на 5 минут. Затем в пробирки добавляли по 150 мкл раствора № 3, встряхивали 1–2 раза, хорошо перемешивали и оставляли в ледяной бане на 30 минут.

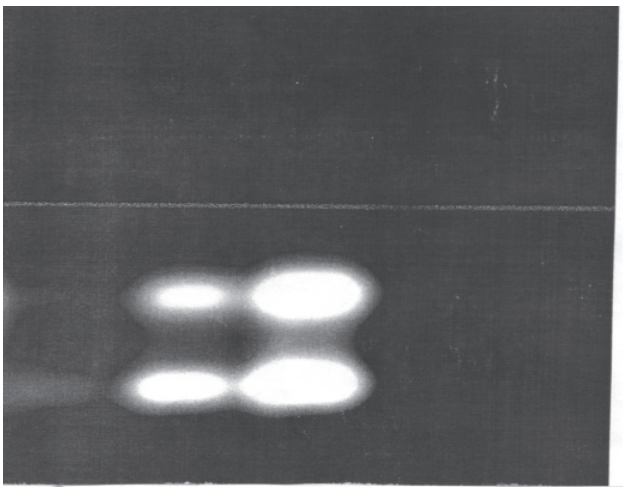
После этого микропробирки центрифугировали в течение 15 минут при 14 000 об/мин. Супернатант отбирали в чистые микропробирки, приливали к нему 400 мкл фенола и центрифугировали в течение 5 минут при 14 000 об/мин. После этого отбирали верхнюю фазу, не содержащую фенол, и добавляли к ней 400 мкл хлороформа, после чего центрифугировали в течение 10 минут при 14 000 об/мин.

Затем снова переливали верхнюю фазу, не содержащую хлороформа, в чистые микропробирки и добавляли 40 мкл 3М ацетата натрия и 1000 мкл 96%-ного перегнанного этанола, перемешивали и оставляли содержимое на 15–30 минут при температуре –20 °С.

На следующем этапе содержимое пробирок центрифугировали в течение 15 минут при 14 000 б/мин. Затем удаляли супернатант, а к осадку добавляли 250 мкл 70%-ного охлажденного при температуре –20°С этанола, несколько раз осторожно переворачивали пробирки для того, чтобы лучше промыть осадок, и снова центрифугировали в течение 2 мин при 14 000 об/мин.

После этого вновь удаляли супернатант, а остатки жидкости удаляли с помощью полосок фильтровальной бумаги. Осадок просушивали на воздухе при открытой крышке микропробирки. Осадок старались не пересушивать. После завершения процедуры высушивания осадок растворяли в 30 мкл ТЕ-буфера.

Выделенную таким образом плазмидную ДНК в дальнейшем использовали для электрофоретического исследования.



3 2 1

Электрофоретический профиль плазмидных ДНК, выделенных из клеток E.coli после их обработки экстрактом чистотела:
1 - клетки без обработки экстрактом чистотела; 2 - клетки после обработки экстрактом чистотела, разведенным в 10 раз; 3 - клетки после обработки экстрактом чистотела без разведения.

Модификация метода состоит в том, что, во-первых, по сравнению со стандартным выделением плазмидной ДНК по методу Birnboim и Doli, уменьшено время выдержки в ледяной бане; во-вторых, не применялась баня, содержащая смесь сухого льда и этанола; в-третьих, использование отечественных центрифуг на 8 000-10 000 об/мин (3.577.6 g) нисколько не снизило процент выхода плазмидной ДНК.

Результаты. Электрофоретические профили плазмидных ДНК, выделенных после обработки исходных бактериальных клеток экстрактом чистотела, представлены на рисунке. Обращает на себя внимание уменьшение концентрации плазмидной ДНК после обработки клеток экстрактом чистотела.

Обсуждение. Алкалоиды имеют в своей структуре положительно заряженный атом азота. Возможно возникновение электростатических сил притяжения между отрицательно заряженным сахарофосфатным остовом ДНК и положительным атомом азота. Кроме положительного атома азота, алкалоиды имеют структуру плоских ароматических колец, которые, по всей видимости, могут интеркалировать в двойную спираль ДНК, изменяя структуру последней, в отличие от односпиральных РНК, поскольку не обнаружено прямого взаимодействия между РНК и компонентами экстракта чистотела [7]. Отсутствие подобного взаимодействия иллюстрирует спектр поглощения экстракта чистотела в присутствии РНК в кюветах сравнения и определения. На спектрах поглощения экстракта чистотела большого не обнаружено смещения спектральных полос, что указывало бы на взаимодействие с РНК.

Заключение. Можно предположить, что препараты чистотела большого подавляют синтез плазмидных ДНК, и их использование может быть перспективным для подавления антибиотикорезистентности клинических штаммов микроорганизмов.

Библиографический список

1. Шагинян, И.А. Роль и место молекулярно-генетических методов в эпидемиологическом анализе внутрибольничных инфекций / И.А.Шагинян // Клиническая микробиология и антимикробная терапия.– 2002.– Т. 2.– №3.- С.-82-95.

2. Birnboim, H.C. A rapid alkaline extraction procedure for screening re- combinant DNA / H.C.Birnboim, S.Doli // Nucleic Acids Res.– 1999.– V. 7.– P. 1513-1523.

3. Козлов, Р.С. Нозокомиальные инфекции: эпидемиология, патогенез, профилактика, контроль / Р.С. Козлов // Клиническая антимикробная терапия. – 2000. – №1. – С.16-32.

4. Бузук, Г.Н. Изменчивость качественного и количественного состава алкалоидов чистотела большого в течение вегетации / Г.Н.Бузук, М.Я.Ловкова, А.А.Булатов // Химико-фармацевтический журнал.–1990.– Т.4.– № 5.- С.50-53.

5. Новые подходы к стандартизации травы чистотела большого / С.В.Первушкин, А.А.Сохина, В.А.Куркин, Г.Г.Запесочная // Фармация.– 1999.– Т.48.– №2. – С.26-27.

6. Фомичева, Е.А. Изучение компонентного состава флавоноидов и фенолкарбоновых кислот в гомеопатических настойках чистотела хроматографическими методами // Е.А.Фомичева, З.П.Костенникова // Фармация.– 2001. – Т.49.– №3. – С.17-19.

7. Рожнова, С.Ш. Значение плазмид в эволюции возбудителей и эпидемического процесса /С.Ш.Рожнова, Л.А.Кафтырева // Эпидемиология и инфекционные болезни.- 2000. – № 5. – С. 25-27.