

Таким образом, анализ информативности нейрофизиологических характеристик, параметров психоэмоциональной сферы и особенностей вегетативного реагирования позволил рекомендовать для прогнозирования успешности обучения управлению тонусом церебральных сосудов с БОС лишь часть из них. В целом отмечается ограниченная значимость личностных психологических характеристик (за исключением гипертимности) и параметров вегетативной реактивности для прогнозирования степени успешности БОС-тренингов у здоровых лиц. Проведенное исследование показало наличие межгрупповых различий по выраженности гипертимности, амплитуды дельта-активности и индекса мощности дельта- и альфа-ритмов, а также по амплитуде волны Р3 когнитивных вызванных потенциалов.

Преобладание в спектре ЭЭГ обследуемых первой группы активности в альфа- и бета-диапазонах и слабая выраженность пространственной синхронизации биопотенциалов характерны для формирования более адекватных условий протекания информационных процессов [7]. Данные изменения могут свидетельствовать об активации таламических пейсмейкерных клеток [11]. Наличие сходных изменений биоэлектрической активности мозга, отмечаемых при БОС по параметрам ЭЭГ, позволяет предположить общность механизмов реализации данных видов биоуправления с обратной связью, заключающихся в изменении уровня функционирования лимбических структур [8].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, учет индивидуальных нейрофизиологических особенностей человека открывает более широкие перспективы для прогнозирования и возможности целенаправленного

использования метода биологической обратной связи по параметрам мозговой гемодинамики. При определении способности к обучению произвольному управлению параметрами церебральной гемодинамики прогностически значимыми являются амплитуда дельта-активности и индекс мощности дельта- и альфа-ритмов электроэнцефалограммы, амплитуда когнитивных вызванных потенциалов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Баевский Р.М., Берсенева А.П. Оценка адаптационных возможностей организма и риска развития заболеваний. – М.: Медицина, 1997. – 233 с.
2. Боксер О.Я. // Физиол. человека. – 1994. – Т. 20, № 2. – С. 5–16.
3. Гнездицкий В.В. Вызванные потенциалы мозга в клинической практике. – Таганрог: Изд-во ТРТУ, 1997. – 252 с.
4. Давыдов А.А., Ковалева Н.И., Иванова Я.А. // Новые материалы и методы в медицине: сб. науч. статей. – Волгоград, 1995. – Т. 51, вып. 2. – С. 86–87.
5. Деларю В.В., Тамбиева Р.А. Методики изучения личности. – Кисловодск, 1998. – 114 с.
6. Долецкий А.Н., Кудрин Р.А. // Эколого-физиологические проблемы адаптации: матер. X Междунар. симп. – М., 2001. – С. 168–169.
7. Щекутьев Г.А. Нейрофизиологические исследования в клинике. – М.: Антидор, 2001. – 232 с.
8. Abarbanel A. // Journal of Neurotherapy. – 1995. – № 2. – P. 15–38.
9. Higuchi S., Liu Y., Yuasa T., et al. // Chronobiol Int. – 2000. – № 5. – P. 669–78.
10. Hunyor S.N., Henderson R.J., Lal S.K., et al. // Hypertension. – 1997. – № 6. – P. 1225–1231.
11. Lubar J.F. // Applied Psychophysiology and Biofeedback. – 1997. – № 2. – P. 111–126.
12. Wickramasekera I. // Applied Psychophysiology and Biofeedback. – 1999. – № 2. – P. 91–105.

Doletzky A.N. Use of neurophysiologic criteria to predict succes of managing tone of cerebral vessels through biofeedback // Vestnik of Volgograd State Medical University. – 2005. – № 2. – P. 8–11.

The check of a hypothesis about the dependence of success full biofeedback management of cerebral vessel tonus on individual neurophysiological features was carried out. The research Revealed intergroup distinctions in a delta-activity amplitude, index of delta and alfa-rhythms capacity on EEG and amplitude of a cognitive evoked potentials.

УДК 576.581.132:616.982.27-039

ФЕНОТИПИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА МУТАНТОВ *BURKHOLDERIA MALLEI*, ДЕФЕКТНЫХ ПО СИНТЕЗУ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ ПРОТЕОЛИТИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ

Н.П. Агеева, Л.К. Меринова, Д.В. Викторов, Н.Г. Плеханова
Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт

Методом транспозонного мутагенеза получены штаммы *B. mallei*, дефектные по продукции экзопроотеаз. Мутанты охарактеризованы по спектру активности внеклеточных ферментов, вирулентности и ряду других свойств. Изучен белковый спектр мутантных штаммов методами электрофо-

реза в SDS-PAAG и иммуноблоттинга, показано связанное с изменениями протеолитической активности штаммов варьирование в составе и качественных характеристиках клеточных белков.

Возбудитель сапа (*B. mallei*) известен как высокопатогенный микроорганизм, способный

вызывать тяжелое инфекционное заболевание человека и некоторых видов животных [2, 3]. Представление о факторах его патогенности до настоящего времени носит достаточно общий характер. Принято считать, что *B. mallei* обладает очень низкой активностью внеклеточных ферментов, которая в ряду таксономических критериев расценивается у этого вида, как отрицательный признак [5]. Вместе с тем, трудно представить, чтобы этот микроорганизм не использовал ферментные системы в реализации своих важнейших биологических свойств. Известно, что родственные *B. mallei* представители рода *Burkholderia* продуцируют ряд ферментов, которые рассматривают в качестве вероятных факторов их патогенности [7]. Так, в последнее время появились данные, указывающие на возможную патогенетическую роль в инфекционном процессе, вызываемом *Burkholderia pseudomallei* и *Burkholderia ceracia*, фосфолипазы С и кислой фосфатазы [6, 9].

ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Выяснить изменения некоторых фенотипических свойств *B. mallei*, в том числе вирулентности, возникающие в связи с особенностями продукции внеклеточных ферментов. С этой целью было проведено получение мутантов, дефектных по синтезу внеклеточных ферментов, изучение у них дополнительных фенотипических свойств и определение взаимосвязи их с признаком ферментативной активности.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

В работе использовали дикие штаммы *B. mallei* Ц-4, 10230, Р-1, В-120, 8, 11, Z-12, Иванович, Ц-5.

Для культивирования *B. mallei* применяли L агар (ЛА), мясо-пептонный агар (МПА), Nutrient agar ("Difco", США) (ПА), агар на основе гидролизата казеина (ГКА).

Дефектные по продукции ферментов мутанты получали с применением транспозонного мутагенеза [1]. Для включения транспозона Tn₅ в хромосому *B. mallei*, штаммы скрещивали с *E. coli* S 17-1 (pSUP5011) на поверхности ЛА 18 ч. Конъюгационные смеси высевали на ГКА с канамицином (10 мкг/мл) и полимиксином (700 мкг/мл). Все Km^RPmx^R клоны трансконъюгантов *B. mallei* с предполагаемыми включениями в хромосому транспозона Tn₅ или плазмиды тестировали на наличие ферментативной активности (гемолитической, протеазной, лецитиназной, липазной).

Ферментативную активность определяли на плотных питательных средах, содержащих необходимые субстраты [8]. Изолированные колонии инкубировали при 37 °С от 2 до 10 суток.

Вирулентность культур определяли на модели золотистых хомячков при подкожном заражении их дозой 1x10⁷ м. к. За животными наблюдали в течение 30 суток, учитывая при этом среднюю продолжительность жизни в сравнении

с контрольной группой, зараженной той же дозой дикого штамма. Авирулентными считали штаммы, не вызывавшие гибели экспериментальных животных при заражении указанной дозой. В отдельных случаях вирулентность оценивали по устойчивости микробных клеток к фагоцитозу перитонеальными макрофагами морской свинки [4].

Для получения тотальных препаратов клеточных белков бактериальные клетки, выращенные в течение 24 ч на плотной питательной среде, суспендировали в минимальном объеме лизирующего буфера (0,0625 М Трис-НСl, рН 6,8, 2 %-й SDS, 5 %-й 2-меркаптоэтанол, 10 %-й глицерин) при соотношении объемов бактериальной массы и лизирующего буфера 1:5. Полученный лизат инкубировали в течение 10 мин при 100 °С. Неразрушенные клетки удаляли центрифугированием в настольной центрифуге (ОПн-8, Россия) при 8.000 об/мин.

Для получения экстрацеллюлярных белков 48-часовую агаровую культуру бактерий смывали 1,0 мл 62 мМ Трис рН 6,8, 150 мМ NaCl, клеточную суспензию встряхивали в течение 2–3 мин., клетки осаждали центрифугированием при 3000 об/мин и отбирали супернатант. Далее к 200 мкл супернатанта добавляли 1,0 мл охлажденного ацетона (–20 °С), инкубировали на льду 30 мин и осаждали преципитат центрифугированием при 8.000 об/мин. Осадок ресуспендировали в 25 мкл лизирующего буфера и инкубировали 5 мин при 100 °С.

Бактериальные белки анализировали методом электрофореза в 11 % полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия (SDS-PAGE) [10].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Первоначально у девяти, имеющихся в нашем распоряжении штаммов *B. mallei*, была изучена способность продуцировать экзопроteaseы, гемолизин, лецитиназу и липазу. Установлено, что все штаммы в той или иной степени обладали ферментативной активностью, проявлявшейся в разные сроки (табл. 1). Первой (через 24–72 ч) наблюдали гемолитическую активность, которая характеризовалась образованием вокруг колоний четких зон полного лизиса эритроцитов. Лецитиназная и липазная активности были замедленными, проявляясь не ранее 8–10-х суток в виде помутнения вокруг колоний. Протеазная активность, в зависимости от штамма, отмечалась на 4–10-е сутки. Характер и величина зон активности варьировали на средах с различными концентрациями молока. Оптимальной для определения протеолитической активности сочли концентрацию, равную 1 %. Она позволяла выявлять функцию протеаз, проявлявшуюся в разные сроки с максимумом на 6-е сутки.

Наиболее выраженной способностью к продукции экзопроteaseы обладали штаммы *B. mallei* Ц-4 и Z-12. При анализе клеточной популяции этих штаммов были обнаружены спонтанно образующиеся, дефектные по ферментативной активности Exp[–] клоны (9 и 15 % соответственно).

Таблица 1

**Ферментативная активность диких штаммов
*B. mallei***

Штамм	Субстраты			
	молоко	кровь	лецитин	tween-80
Ц-4	10 ¹	4	3	4
10230	2	1	3	4
P-1	3	1	2	3
B-120	10	—	3	3
8	3	10	10	10
11	Под колонией	3	3	8
Z-12	10	1	3	2
Иванович	3	—	4	10
Будапешт	Под колонией	—	5	4
Ц-5	4	2	3	4

Примечание. 1 – здесь и далее диаметр зон активности в мм

Дальнейшее исследование популяции *Exp⁻* клонов установило, что она состояла только из *Exp⁻* вариантов. После нескольких пересевов на среде с молоком клоны, первоначально регистрируемые как *Exp⁻*, начали проявлять протеолитическую активность, хотя степень ее была намного ниже, чем у клонов, исходно отмеченных как *Exp⁺*. Штаммы *B. mallei* Ц-4 и Z-12, наряду с протеазной, проявляли также гемолитическую активность, неоднородную по срокам лизиса эритроцитов. Популяции обоих штаммов были стабильными по *Hem⁺* признаку и не образовывала *Hem⁻* вариантов.

Лецитиназная активность штаммов характеризовалась формированием вокруг крупных колоний сплошных зон ферментативного действия различной интенсивности, мелкие колонии были окружены зонами из отдельных преципитатов или сами колонии имели радужный отблеск. В популяциях штаммов наблюдались единичные клоны, не обладавшие лецитиназной активностью, способные после нескольких пассажей на среде с лецитином восстанавливать продукцию лецитиназы.

По уровню продукции липазы популяции штаммов *B. mallei* Ц-4 и Z-12 также были неоднородны, выделялись отдельные *Lip⁻* клоны, которые после нескольких пересевов восстанавливали липазную активность.

Таким образом, исследование у *B. mallei* активности экзоферментов показало, что в наибольшей степени у микроорганизма выражена экзопроteaseзная и гемолитическая активности. Признаки продукции соответствующих ферментов достоверно выявлялись и могли служить маркерами в генетических исследованиях.

Для получения инсерционных мутантов, дефектных по синтезу указанных внеклеточных

ферментов, были использованы штаммы *B. mallei* 10230 и Ц-4, обладавшие, как было показано ранее, способностью эффективно воспринимать применявшийся для мутагенеза транспозон Tn5 [1]. Канамицинрезистентные трансконъюгаты (*Km^R*) *B. mallei*, несущие маркер транспозона, в скрещиваниях с донором *E. coli* S 17-1 (pSUP5011) образовывались с частотой 10^{-5} на клетку конъюгационной смеси. После ряда конъюгационных скрещиваний было изолировано 69 *Exp⁻* и 12 *Hem⁻* мутантных клонов, дефектных, соответственно, по экзопроteaseзной и гемолитической активности.

Варианты, первоначально обозначенные как *Hem⁻*, характеризовались сниженной продукцией гемолизина. У этих мутантов также отсутствовали экзопроteaseзы. Однако признак *Hem⁻* оказался нестабильным и при хранении штаммов на питательных средах возвращался к исходному фенотипу.

Свойства некоторых *Exp⁻* мутантов штамма *B. mallei* Ц-5 представлены в табл. 2. Среди них только один мутант не продуцировал гемолизин. У остальных штаммов, сохранивших гемолитическую активность, изменился размер зон гемолиза и их характер.

Определение вирулентности *Exp⁻* мутантов на модели золотистых хомячков показало, что все они в определенной степени снизили вирулентность, о чем свидетельствовало увеличение продолжительности жизни экспериментальных животных в 2–3 раза. Некоторые из *Exp⁻* мутантов были полностью авирулентными, не вызывая гибели животных при заражении дозой 1×10^7 м.к. Изменения вирулентности инсерционных мутантов сопровождалась их более высокой фагоцитательностью по сравнению со штаммом дикого типа. Разница в количестве микробных клеток, фагоцитированных перитонеальными макрофагами морской свинки, была особенно отчетливой на начальных сроках экспозиции. Так, среднее количество фагоцитированных бактерий *B. mallei* Ц-5 после 1 ч инкубации, составляло 4, тогда как у инсерционных мутантов *B. mallei* Ц-5 оно достигало 15–17 (рис. 1). При исследовании устойчивости этих мутантов к фагоцитозу перитонеальными макрофагами морской свинки *in vitro* было отмечено снижение способности их к внутриклеточному выживанию.

Дефектные по продукции внеклеточных ферментов штаммы отличались от диких жизне-способностью в питательных средах. При хранении в полужидком агаре с пересевами каждые 6 мес. (обычные условия поддержания *B. mallei*) некоторые из них утрачивали способность к росту через 2–4 месяца, через один год только 50 % культур оставалось жизнеспособными, через два года погибали все клоны. В то же время, при высушивании в условиях внешней среды мутанты *B. mallei* практически не отличались по срокам выживания от исходного дикого штамма.

Таблица 2

Свойства мутантов *B. mallei* Ц – 5 chr : Tn 5, дефектных по продукции внеклеточных ферментов

№ мутанта	Ферментативная активность		Вирулентность ²
	протеолитическая	гемолитическая ¹	
3	20	20 / 30	10
4	0	0,5 / 4	14
5	0	1 / 8	15
6	0	2 / 7	> 30
7	0	1 / 6	> 30
8	5	0,5 / 6	13
9	5	0,5 / 2	14
10	0	3 / 7	16
11	5	1 / 7	12
12	15	0 / 3	12
13	0	0	14
14	0	4 / 9	> 30
15	0	3 / 8	> 30
18	0	0,5 / 10	> 30
21	15	2 / 8	15
22	15	3 / 9	18
25	0	1 / 7	14
28	0	10 / 20	16
29	20	5 / 12	13
Ц-5 дикий	10	15 / 0	6

Примечание. ¹ числитель – зона полного гемолиза, знаменатель – зона неполного гемолиза; ² средняя продолжительность жизни золотистых хомячков (сут.).

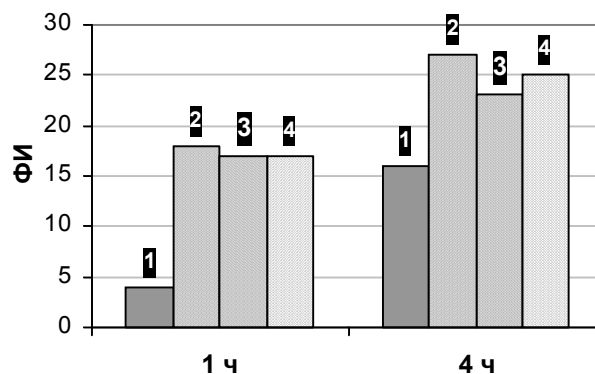


Рис. 1. Фагоцитоз клеток исходного штамма *B. mallei* Ц-5 (Wt) и мутантов *B. mallei* Ц-5 Exp-: ФИ – фагоцитарный индекс (среднее количество фагоцитированных м.к. на 100 фагоцитов); штаммы *B. mallei*: 1 – Ц-5 (Wt); 2 – Ц-5 Exp11; 3 – Ц-5 Exp12; 4 – Ц-5 Exp21

Наряду с этим, у мутантных штаммов было проведено исследование экспрессии общеклеточных белков. Электрофоретический анализ в SDS-PAGE показал, что Exp⁻ клоны *B. mallei* Ц-5 с различным уровнем протеолитических ферментов не отличались от дикого штамма по составу и уровню продукции основных мажорных протеинов с M_r 25–30 kDa, 39–45 kDa и 150–200 kDa. Однако у них были обнаружены изменения в спектре общеклеточных белков с преобладанием белков M_r 69–71 kDa или гиперпродукцией протеинов M_r 110–115 kDa (рис. 2).

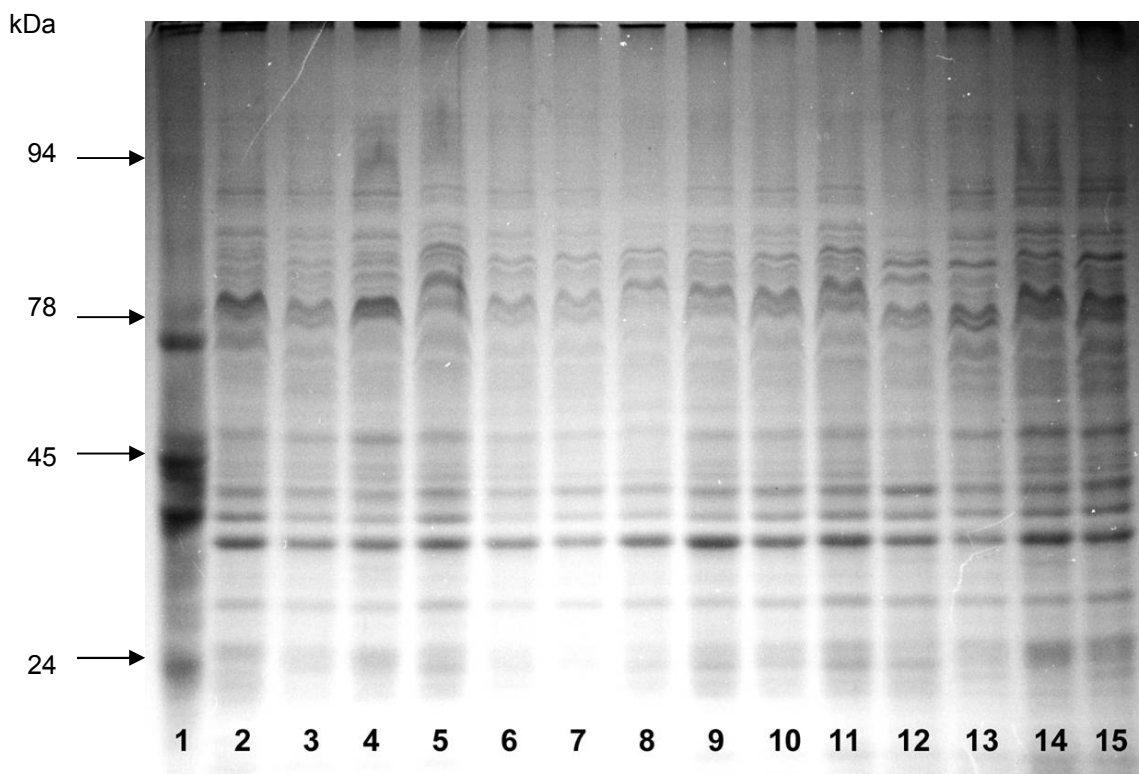


Рис. 2. SDS-PAGE клеточных белков исходного штамма *B. mallei* Ц-5 (Wt) и мутантов *B. mallei* Ц-5 Exp⁻: 1 – маркерные белки; 2 – Exp13; 3 – Exp22; 4 – Exp25; 6 – Exp11; 7 – Exp9; 8 – Exp8; 9 – Exp3; 10 – Exp15; 11 – Exp14; 12 – Wt; 13 – Exp21; 14 – Exp28; 15 – Exp29

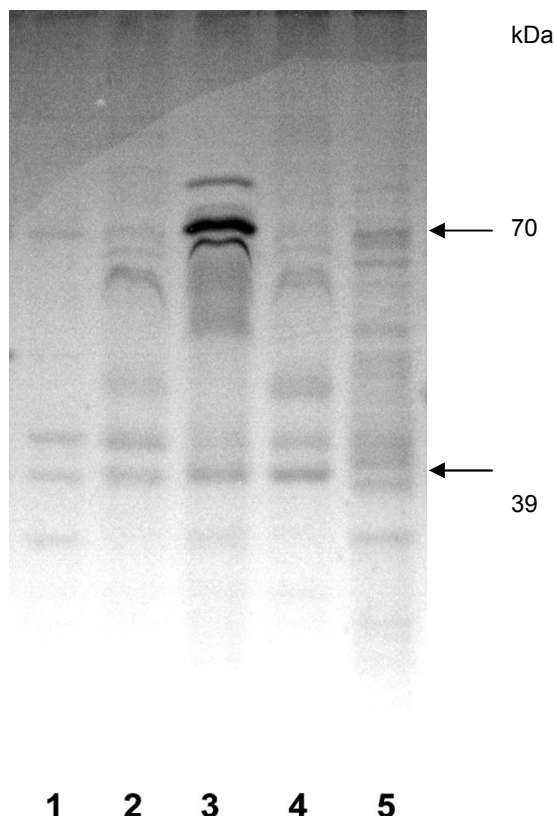


Рис. 3. SDS-PAGE экстрацеллюлярных белков мутантных штаммов *B. mallei* Ц-5 Exp⁻:
1 – Exp15; 2 – Exp21; 3 – Exp12; 4 – Exp11; 5 – Wt (исходный штамм дикого типа)

Сравнительный анализ в SDS-PAGE секреторных белков напротив выявлял у штаммов *B. mallei* Ц-5 Exp⁻ снижение продукции протеинов в диапазоне M_r 18–71 kDa. У мутантного штамма *B. mallei* Ц-5 Exp 12, наряду со снижением уровня экспрессии белков M_r 45–54 kDa, наблюдалась гиперпродукция протеинов с M_r 71 и 90 kDa, причем продукция белка M_r 71 kDa, как минимум, на порядок превышала этот показатель штамма дикого типа (рис. 3).

Таким образом, проведенные исследования показали, что штаммы *B. mallei* обладают способностью к продукции внеклеточных протеолитических ферментов, активность которых проявляется в поздние сроки. В популяциях штаммов отсутствуют клоны, стабильно утрачивающие признак экзопротеазной активности. Однако мутанты, дефектные по продукции экзопротеаз, могут быть получены методом инсерционного мутагенеза. Exp⁻ мутанты, селекционированные в данной работе путем включения в хромосому *B. mallei*

транспозона Tn5, характеризуются замедленной в сравнении с исходными штаммами продукцией экзопротеаз, либо полным ее отсутствием.

Утрата признака экзопротеазной активности сопровождается изменением ряда других фенотипических свойств микроорганизма, в том числе, вирулентности, что определяет известное сходство мутантов этого типа с описанными дефектными по внеклеточным ферментам штаммами *B. pseudomallei* [7]. Вместе с тем, очевидным отличием рассматриваемых здесь мутантов *B. mallei* является отсутствие у них нарушений в продукции одновременно всего комплекса внеклеточных ферментов, включающего помимо экзопротеаз также гемолизин, лецитиназу, липазу, что указывает на возможное различие в способах секреции экзопродуктов, существующее у этих близкородственных видов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Выполненное исследование позволило дать начальную характеристику инсерционных мутантов *B. mallei* с нарушенной продукцией внеклеточных протеолитических ферментов. Дальнейшая работа в этом направлении будет способствовать установлению роли экзоферментов в реализации важнейших биологических свойств этого опасного патогена человека и животных.

ЛИТЕРАТУРА

1. Агеева Н.П., Меринова Л.К. // Генетика и биохимия вирулентности возбудителей особо опасн. инф.: матер. Росс. научн. конф. – Волгоград, 1992. – С. 26–27.
2. Беляков В.Д., Ряпис Л.А., Илюхин В.И. Псевдомонады и псевдомонады. – М.: Медицина, 1990. – 224 с.
3. Илюхин В.И. // Журн. микробиол., эпидемиол., иммунобиол. – 1985. – № 2. – С. 110–112.
4. Попов С.Ф., Мельников Б.И., Курилов В.Я. и др. // Взаимодействие возбудителя мелиоидоза с фагоцитами хозяина: сб. научн. работ. – Волгоград, 1990. – Вып. 4. – С. 184–190.
5. Bach-Toan-Vinh. // Ann. Inst. Past. – 1965. – Vol. 109. – № 3. – P. 460–468.
6. Burntack M., Bolton A., Brett P., et al. // J. Microbiol. – 2001. – Vol. 147. – P. 111–120.
7. De Shazer D., Brett P.J., Burntack M.W. et al. // J. Bacteriol. – 1999. – Vol. 181. – P. 4661–4664.
8. Difco manual. Dehydrated culture media and reagents for microbiology. Tenth edition. // Difco laboratories, Detroit, Michigan 48232, USA, 1155 pp.
9. Korbsrisate S., Suwanasai N., Lulaporn A., et al. // J. Clin. Microbiol. – 1999. – Vol. 37. – P. 3742–3745.
10. Laemmli U.K. // Nature. – 1970. – Vol. 227. – P. 680–685.

Ageeva N.P., Merinova L.K., Victorov D.V., Plehanova N.G. Phenotypic characterization of Burkholderia mallei mutants defected in the synthesis of extracellular proteases // Vestnik of Volgograd State Medical University. – 2005. – № 2. – P. 11–15.

Strains of *B. mallei*, defective in production of extracellular enzymes were isolated using transposon mutagenesis method. Mutants were been characterized by activity of extracellular enzymes, virulence and some other properties. The method of electrophoresis in SDS – PAAG and immunoblotting were employed for analysing of protein profiles. It was revealed that composition and quantity of protein accounted for changes of proteolytic activity.