

- J. Phys. Chem. B. 2009. v. 113. № 40. P. 13437-13445.
7. **Friedl P., Wolf K., von Andrian U.H., Harms G.** Biological second and third harmonic generation microscopy // *Curr. Protoc. Cell Biol.*, Chapter 4, unit 4.15. 2007.
 8. **Gouk S.S., Lim T.M., Teoh S.H., Sun W.Q.** Alterations of human acellular tissue matrix by gamma irradiation: histology, biomechanical property, stability, in vitro cell repopulation, and remodeling // *J. Biomed. Mater. Res. Part B: Appl. Biomater.* 2008. v. 84B. P. 205–217.
 9. **Miles C.A., Siokowska A., Hullin S.L., Sims T. J., Avery N.C., Bailey A.J.** Identification of an intermediate state in the helix-coil degradation of collagen by ultraviolet light // *J. Biol. Chem.* 2000. v. 275. № 42. P. 33014-33020.
 10. **Miles C.A., Wardale R.J., Birch H.L., Bailey A.J.** Differential scanning calorimetric studies of superficial digital flexor tendon degeneration in the horse // *Equine Vet. J.* 1994. v. 26. № 4. P. 291-296.
 11. **Roth S., Freund I.** Optical second-harmonic scattering in rat-tail tendon // *Biopolymers.* 1981. v. 20. № 6. 1271 p.
 12. **Seto A., Gatt Jr C.J., Dunn M.G.** Radioprotection of tendon tissue via crosslinking and free radical scavenging // *Clin. Orthop. Relat. Res.* 2008. v. 466. P. 1788–1795.
 13. **Shah N.B., Wolters W.F., Morrissey M., Sun W.Q., Bischof J.C.** Fourier transform infrared spectroscopy investigation of native tissue matrix modifications using a gamma irradiation process // *Tissue Engineering Part C: Methods.* 2009. v. 15. № 1. P. 33-40.
 14. **Sionkowska A.** Thermal stability of UV-irradiated collagen in bovine lens capsules and in bovine cornea. // *J. Photochem. Photobiol. B.* 2005. v. 80. № 2. P. 87-92.
 15. **Sionkowska A.** Thermal denaturation of UV-irradiated wet rat tail tendon collagen // *Int. J. Biol. Macromol.* 2005. v. 35. P. 145–149.
 16. **Sun W.Q., Leung P.** Calorimetric study of extracellular tissue matrix degradation and instability after gamma irradiation // *Acta Biomaterialia*, 2008. v. 4. № 4. P. 817-826.

The effects of gamma irradiation on the collagen in rat tail tendon *in vitro*

N.Yu. Ignatieva, O.L. Zakharkina, M.V. Kochueva, A.V. Maslennikova,
V.A. Kamensky, V.N. Bagratashvili

The effect of gamma irradiation therapy on the collagen structure of rat tail tendon has been studied. The decrease in the denaturation enthalpy and increase in trypsin susceptibility was related with a damage of triple helical macromolecules ($19 \pm 7\%$). Destabilized collagen fraction and the alteration in biopolymers-water interaction were observed by differential scanning calorimetry. The loosening of secondary and tertiary fiber bundles was revealed by second harmonic generation microscopy. No significant degradation of anisotropic properties and tissue architectonics was revealed by cross-polarization optical coherent tomography technique. The instant response of collagen matrix on ionized radiation is related to degradation of collagen at the molecular level of organization.

Key words: ionized radiation, rat tail tendon, collagen, second harmonic generation microscopy.

Исследование антибиотикорезистентности микроорганизмов электрохимическими методами

Я.М. Чаленко¹, В.В. Шумянцева¹, С.А. Ермолаева², А.И. Арчаков¹

¹ – НИИ биомедицинской химии В.Н. Ореховича РАМН, Москва

² – НИИ эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи, Москва

Контактная информация: yaroslavazaka@yandex.ru

Разработан электрохимический метод анализа клеток *E.coli JM109* с помощью циклической вольтамперометрии и квадратно-волновой вольтамперометрии. На основе электроактивности бактериальных клеток предложена система для определения чувствительности микробиологического материала к антибиотикам. Электрохимический метод позволяет получать данные по антибиотикорезистентности клеток *E.coli JM109* в течение 2-5 часов.

Ключевые слова: *E.coli JM109*, электрохимия, антибиотикорезистентность.

Инфекционные заболевания являются серьезной проблемой здравоохранения [1]. По данным федеральной службы государственной статистики в России за 2010 г. на 1000 человек приходится 34,6 случаев инфекционных (бактериальных и некоторых паразитарных) заболеваний [2]. Пищевые отравления и загрязнение воды, внутрибольничные инфекции и пандемии, инфекционные агенты вызывают заболевания по всему миру. Своевременное выявление возбудителя и его чувствительности к лекарственным препаратам позволяют снизить количество осложнений, уменьшить риск летальных исходов, подобрать адекватную и эффективную терапию. Заблаговременное определение чувствительности микроорганизмов к химиотерапевтическим препаратам является важной диагностической целью в практической медицине, санитарно-гигиенической службе, экологической и пищевой промышленности. С появлением в медицинской практике антибиотиков и последующим формированием устойчивости к ним микроорга-

низмов возникала необходимость оценки чувствительности возбудителей к данным препаратам как ориентира для выбора лекарственной терапии. Таким образом, в современных условиях широкого распространения антибиотикоустойчивых, в том числе и полирезистентных, штаммов микроорганизмов рациональная химиотерапия и химиопрофилактика вызываемых ими инфекционных болезней, а также оценка эффективности новых лекарственных препаратов возможны только при условии определения степени чувствительности к ним микроба-возбудителя. Существующие современные методы определения чувствительности, несмотря на свои несомненные достоинства, не позволяют быстро и качественно проводить исследования на антибиотикочувствительность микроорганизмов в силу некоторых недостатков, основными из которых является, во-первых, потребность в выделении чистой культуры. Эта процедура занимает от 3 до 10 дней, что не позволяет своевременно начать и проводить адекватную индивидуальную

специфическую терапию. Во-вторых, невозможность оценить роль многих некультивируемых микроорганизмов в этиологии заболевания, а также тех, которые погибают на этапах доставки материала в лабораторию. В-третьих, трудоемкость и малая пропускная способность, громоздкость и/или дороговизна существующих экспресс-методов.

Всё это свидетельствует о необходимости создания новых методических приёмов, позволяющих судить о степени чувствительности микроба-возбудителя к антибиотикам в более короткие сроки после начала исследования. Таким требованиям соответствуют различные типы биосенсоров. Ранее были разработаны амперометрические микробные биосенсоры для определения соединений, угнетающих развитие микроорганизмов. Предложены биосенсоры для определения цианидов и синильной кислоты по подавлению респираторной активности *Nitrosomonas europaea*, *Thiobacillus ferrooxidans*, *Saccharomyces cerevisiae* и *Pseudomonas fluorescens* [3, 5]. Разработана проточная система CellSense с микробными биосенсорами на основе печатных графитовых электродов с иммобилизованными *Escherichia coli*, сигналом которых служит ток восстановления, измеряемый в присутствии медиатора электронного переноса – ферроцианида калия [4]. Однако приведенные системы являются косвенными и нуждаются в присутствии медиатора-посредника для оценки сигнала, что, в свою очередь, может привести к ошибкам измерения и усложняет процедуру проведения экспериментов.

Цель. Разработка электрохимических биосенсоров на основе печатных графитовых электродов для определения чувствительности клеток *E.coli JM109* к антимикробным препаратам.

Материалы и методы

Электрохимические исследования проводили с помощью потенциостата «PGSTAT AUTOLAB 12» («EcoChemie», Нидерланды), снабженного программным обеспечением GPES, в 0,1 М калий-фосфатном буфере, содержащем 0,05 М NaCl, pH 7,4 (рабочий буфер), при комнатной температуре. В работе использовали трехконтактные электроды, полученные методом трафаретной печати (ООО НПП «ЭЛКОМ», Россия); с графитовыми рабочим и вспомогательным электродами и хлорсеребряным электродом сравнения. Диаметр рабочего электрода — 2 мм. Цикловольтамперограммы (CV) регистрировали при скорости сканирования 100 мВ/с. Параметры, используемые при исследовании квадратно-волновой вольтамперометрии (SWV): начальный потенциал 600 мВ, конечный потенциал -600 мВ (для восстановительных процессов), шаг потенциала 10 мВ, амплитуда 20 мВ, частота 10 Гц. В работе использовались следующие реактивы: дидодецилдиметиламмоний бромид (ДДАБ) фирмы Sigma-Aldrich (США), ампициллин, эритромицин, цефепим, амикацин-ваил. В качестве биологического материала использовалась очищенная культура *E.coli JM109*. Концентрация клеток в 50 мкл была подсчитана методом серийных разведений и высеванием на агаризованную среду [5].

Приготовление биосенсоров. На поверхность рабочего графитового электрода наносили 2 мкл свежеприготовленного 0,1 М раствора ДДАБ в хлороформе (и оставляли на 20 мин. при +4°C), после испарения хлороформа ДДАБ наносили 2 мкл суспензии клеток *E.coli* (концентрация клеток на электроде 16×10^6 клеток/сенсор). Инкубировали биосенсор в течение 30-ти мин. при +37°C. После

инкубации модифицированный электрод опускали в рабочий буфер и выдерживали при +37°C – 25 мин. для стабилизации системы.

Постановка экспериментов. Каждый электрод использовался однократно и только с одним антибиотиком. В качестве контроля использовались аналогичные электроды, содержащие ДДАБ/*E.coli JM109*, но вместо добавки антибиотика производилась добавка рабочего буфера. Объем вносимого в систему вещества составлял 5 мкл. Антибиотики были подобраны исходя из спектра действия. Ампициллин, амикацин-ваил и цефепим использовали в концентрации 500 мкг/мл. Эритромицин — в концентрации 10 мкг/мл. Измерение электрохимических параметров электродов проводилось с часовым интервалом. После каждого измерения система помещалась в термостат при +37°C для соблюдения адекватных условий жизнедеятельности микроорганизмов. Диапазон времени, необходимый для получения результатов о чувствительности *E.coli JM109* к антибиотикам, составляет от 4-х до 6-ти ч в зависимости от вида антибиотика. Значение снижения сигнала определялось по формуле:

$$I\% = \frac{I_t}{I_1} \times 100\%,$$

где I_1 -величина тока базового значения, I_t -величина тока после добавления в систему антибиотика, t -время инкубации с антибиотиком ($t=1,2,3...n$), $I\%$ -искомая величина.

Результаты и их обсуждение

Первые эксперименты были направлены на определение возможности детектировать *E.coli JM109* непосредственно на электроде прямым методом

(без вторичных посредников). При измерении электрохимических параметров ПЭ/ДДАБ на циклической вольтамперограмме отсутствуют пики, а при встраивании в матрицу (ДДАБ) клеток *E.coli JM109* появляется характерный катодный пик в области от -0,4V, который в дальнейшем был принят в качестве базового анализируемого сигнала. На рис. 1 представлены циклические вольтамперограммы для электрода, модифицированного ДДАБ (ПЭ/ДДАБ), и электрода, содержащего ДДАБ и *E.coli JM109* (ПЭ/ДДАБ/*E.coli JM109*). На рис. 2 представлены квадратно-волновые вольтамперограммы для ПЭ/ДДАБ и ПЭ/ДДАБ/*E.coli JM109*.

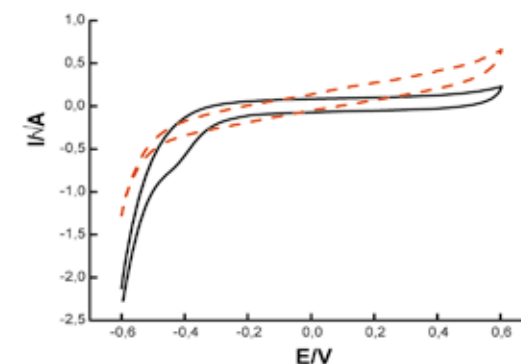


Рис. 1. Циклические вольтамперограммы электрода, модифицированного ДДАБ(пунктирная линия) и электрода ДДАБ/*E.coli JM109* (сплошная линия) в аэробных условиях, скорость сканирования 100мВ/с. Концентрация клеток — 16×10^6 КОЕ/электрод. Объем электролита — 1 мл, 0,1 М калий-фосфатного буфера, 0,05 М NaCl pH 7,4.

Появление катодного пика в области -0,4 V свидетельствует о наличии электронного переноса между *E.coli JM109* и поверхностью рабочего электрода. В работе L. Peng и др. [6] исследовали электрохимические параметры клеток *Shewanella oneidensis* при иммобилизации на стеклогуглеродном электроде.

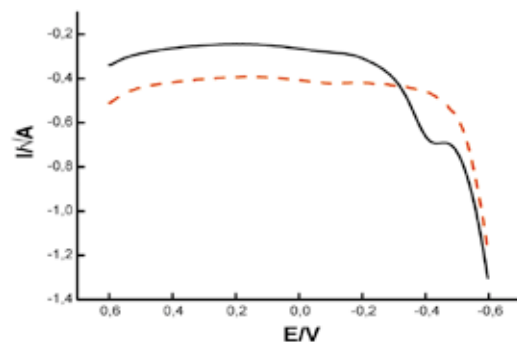


Рис. 2. Квадратно-волновые вольтамперограммы электрода, модифицированного ДДАБ (пунктирная линия) и электрода ДДАБ/*E.coli JM109* (сплошная линия) в аэробных условиях. Частота — 10 Гц. Концентрация клеток — 16×10^6 КОЕ/электрод. Объем электролита — 1 мл, 0,1 М калий-фосфатного буфера, 0,05 М NaCl, pH 7,4.

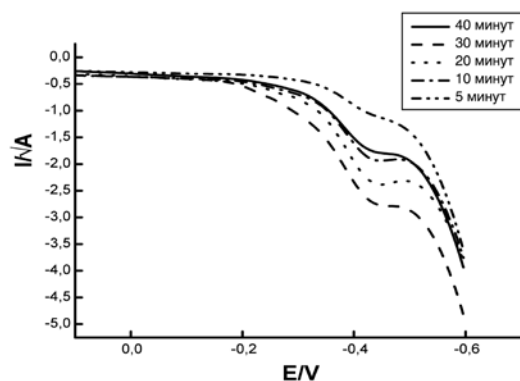


Рис. 3. Квадратно-волновые вольтамперограммы для электродов ДДАБ/*E.coli JM109* в аэробных условиях, в зависимости от времени инкубации клеток на электроде при +37°C. Концентрация клеток 16×10^6 КОЕ/электрод. Время инкубации электродов с клетками в электролите — 25 мин. Объем электролита — 1 мл, 0,1 М калий-фосфатного буфера, 0,05 М NaCl, pH 7,4.

Электронный перенос между бактериальными клетками и поверхностью рабочего электрода происходил с участием цитохрома C, локализованного на внешней мембране клетки, и окислительных мембранных белков OmcA и MtrC. Авторы зарегистрировали пик в циклической вольтамперограмме на не модифициро-

ванном стеклоуглеродном электроде, равный -0,42 V. Полученные нами данные согласуются с данными работы [6].

Время инкубации клеток, необходимое для адсорбции клеток на электроде, а также время, необходимое для стабилизации системы в буфере для получения более четких характеристик анализируемого сигнала, определялось экспериментальным путем. На рис. 3 представлены квадратно-волновые вольтамперограммы для ПЭ/ДДАБ/*E.coli JM109* в зависимости от времени инкубации.

Полученные характеристики сигналов в зависимости от времени инкубации приведены в табл.

Были проведены серии экспериментов по определению чувствительности *E.coli JM109* к различным антибиотикам. На рис. 4 представлена диаграмма, отражающая зависимость величины снижения сигнала от времени инкубации ПЭ/ДДАБ/*E.coli JM109* с различными антибиотиками. Оптимальным является время инкубации, равное 30 мин. За 100% принималась величина катодного пика, измеренная перед добавлением в систему антибиотика.

Для Цефепима и Амикацина максимальное снижение величины катодного тока на 92% и 81% соответственно происходит через 5 ч от момента инкубации системы с антибиотиком. Для Ампициллина максимальное снижение величины катодного тока происходит через 4 ч и составляет 95%. Эритромицин не дает снижения величины катодного тока, а наоборот происходит его увеличение. Через 5 ч высота катодного пика составляет 225%, т.к. данный антибиотик не действует на *E.coli JM109* в концентрации 10 мкг/мл.

Выводы

Разработана система электроанализа

Таблица

Характеристики анализируемого сигнала от электрода ПЭ/ДДАБ/*E.coli JM109* в зависимости от времени инкубации клеток на электроде.

Время инкубации	Положение пика	Высота пика	Площадь пика
5 минут	-0,411	8,79 e-8	5,87 e-9
10 минут	-0,416	2,34 e-7	2,91 e-9
20 минут	-0,416	3,08 e-7	3,77 e-8
30 минут	-0,421	4,65 e-7	4,50 e-8
40 минут	-0,411	2,44 e-7	2,18 e-8

для бактериальных клеток *E.coli JM109* на печатных графитовых электродах, модифицированных ДДАБ. Чувствительность *E.coli JM109* к ряду антибиотиков (амикацин, цефепим, ампициллин, эритромицин) была исследована с помощью электрохимических методов (циклвольтамперометрия, квадратно-волновая вольтамперометрия). К преимуществам данной системы можно отнести применение электродов, полученных методом

трафаретной печати, что в свою очередь приводит к миниатюризации электроанализа, возможности модификации рабочей поверхности электродов, широкому диапазону рабочих потенциалов; использование минимальных объемов исследуемого материала (1-2 мкл); отсутствие вторичных посредников, что сокращает время и упрощает процедуру анализа.

Список литературы

1. Kaitanis C., Santra S., Perez J.M.

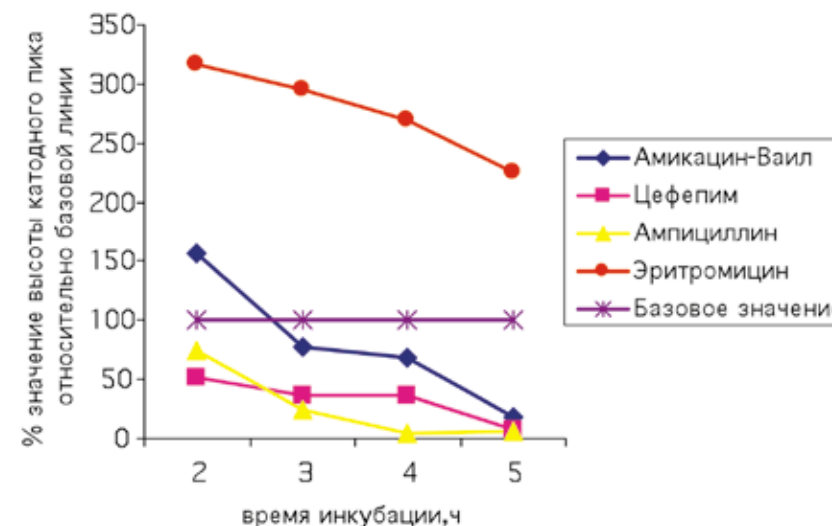


Рис. 4. Сводная диаграмма данных по экспериментам, проведенным на модифицированных электродах с кишечной палочкой штамма *JM109* (16×10^6 КОЕ/электрод) с добавлением в систему различных антибиотиков (цефепим-Cf, ампициллин-Amp, амикацин-Amk, эритромицин-Em в объеме 5 мкл (концентрации веществ указаны в названии оси)) и в качестве контроля с добавлением 5 мкл буфера.

Emerging nanotechnology-based strategies for the identification of microbial pathogenesis // *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2010. P. 408-423.

2. Здравоохранение в России. 2009: Стат.сб./Росстат. М. 2009. 365 с.
3. Будников Г.К., Евтюгин Г.А., Майстренко В.Н. Модифицированные электроды для вольтамперометрии в химии, биологии и медицине. 2010. с. 416.
4. Farre M., Barcelo D., Characterization of wastewater toxicity by means of a

whole-cell bacterial biosensor, using *Pseudomonas putida* in conjunction with chemical analysis // *J. basic Microbiol.* 46 (2006) 5. P. 339-347.

5. ГОСТ Р 52816-2007.
6. Peng L., You S., Wang J., Carbon nanotubes as electrode modifier promoting direct electron transfer from *Shewanella oneidensis* // *Biosensor and Bioelectronics*. 2010. P.1248-1251.

Invesbidgation of antibiotic resistance of microorganisms by the usage of electrochemical methods

Ya.M. Chalenko, V.V. Shumyanceva, S.A. Ermolaeva, A.I. Arhcakov

Electrochemical method for analysis of *Escherichia coli* strain JM109 by cyclic voltammetry and square wave voltammetry was developed. Based on the electrochemical activity of bacterial cells a system for determining the sensitivity of microbiological material to antibiotics was proposed. Electrochemical method provides data on antibiotic resistance of *E.coli* JM109 cells for 2-5 hours.

Key words: *E.coli* JM109, electrochemistry, antibiotic resistance.



ЛАБОРАТОРНЫЕ ЖИВОТНЫЕ

Селекционно-генетическая и экспериментальная работа с мини-свиньями светлогорской популяции

Н.В. Станкова, Г.Д. Капанадзе

Научный центр биомедицинских технологий РАМН, Московская область

Контактная информация: к.б.н. Станкова Наталия Владимировна sinayva@yandex.ru

Описаны приемы селекционной работы в популяции лабораторных светлогорских мини-свиней. Приведено сравнение основных зоотехнических показателей мини-свиней различных пород.

Ключевые слова: светлогорские мини-свиньи, селекция, эксперимент.

Использование мини-свиней для медико-биологических целей является актуальным направлением лабораторного животноводства как у нас в стране, так и за рубежом. Ведутся различные работы по усовершенствованию этого вида лабораторных животных в Англии, Японии, Германии, США и других странах, где все шире используются карликовые свиньи в качестве биологических моделей. Они играют важную роль во многих медико-биологических исследованиях, касающихся сотен заболеваний, а также изучения широкого круга проблем, имеющих важное селекционно-генетическое значение. Трудно переоценить огромные возможности доклинических испытаний возрастающего потока новых фармакологических препаратов на свиньях, что надежно продлевает на мышах, крысах и других мелких традиционных лабораторных животных часто невозможно, поскольку эти животные, в отличие от свиней, не являются всеядными. Трудно-

сти возникают и из-за разного липидного обмена и других причин [2, 6]. В нашем Центре продолжается работа по усовершенствованию светлогорских мини-свиней отечественной селекции.

Материалы и методы

В прошлых номерах мы рассказывали о выведении и системе разведения светлогорских мини-свиней [1, 4, 5]. В имеющейся популяции ведется чистопородное разведение по линиям. Основными селекционируемыми признаками считаются: низкая живая масса, стрессустойчивость, белая масть. Здесь мы приводим в качестве сравнения некоторые показатели светлогорских мини-свиней с различными зарубежными породами.

Результаты и их обсуждение

Для достоверного проведения какого-либо эксперимента с использованием животных необходимо определенное их количество. В лабораторных условиях удобны