

УДК 57.011. 579.61. 579.22

ХРОНОБИОЛОГИЧЕСКИЙ ПОДХОД К ИЗУЧЕНИЮ БИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*

Тимохина Т.Х., Губин Д.Г., Паромова Я.И., Николенко М.В.

ГБОУ ВПО «Тюменская государственная медицинская академия» Минздрава России,
Тюмень, e-mail: dgubin@mail.ru

Изучена пролиферативная и гемолитическая активность музейных и госпитальных изолятов *Staphylococcus aureus* в течение суток. Учитывали следующие характеристики метода: период ритма, МЕЗОР, амплитуда, акрофаза. Ритмометрический анализ выявил у музейных штаммов *S. aureus* ведущий циркадианный ритм биологической активности с акрофазами в вечерние и ночные часы. Для госпитальных изолятов *S. aureus* характерна гетерогенность биоритмов пролиферации с преобладанием ультрадианных вкладов ритмов со смещением акрофаз от соответствующих параметров музейных штаммов. Хронобиологический подход позволил выявить гемолитическую активность в ночное время у госпитального изолята, типированного как негемолитический. Проведенный сравнительный анализ выявил достоверную прямую корреляцию пролиферативной и гемолитической активности музейных изолятов *S. aureus*, а у госпитальных изолятов данные показатели не были значимо связаны между собой.

Ключевые слова: *Staphylococcus aureus*, пролиферативная активность, гемолитическая активность, циркадианные, ультрадианные ритмы

CHRONOBIOLOGY OF PROLIFERATION AND HEMOLYTIC ACTIVITY IN *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*

Timokhina T.K., Gubin D.G., Paromova Y.I., Nikolenko M.V.

Tyumen Medical Academy, Tyumen, e-mail: dgubin@mail.ru

24-hour dynamics in proliferation and hemolytic activity of *Staphylococcus aureus* was studied and compared in established strains vs. strains isolated from patients. Linear least-squares and cosinor analyses were used to validate presence of rhythms with certain periods and its parameters (MESOR, amplitude, acrophase). 24-hour rhythm with nocturnal acrophase has been revealed in established strains. In hospital strains rhythms were more heterogeneous with predominant ultradian dynamics and phases differed from those of established strains. Nocturnal phase in hemolytic activity was preserved in hospital strain, labeled as «non-hemolytic». Comparative analysis as well showed significant positive correlation between proliferation and hemolytic activity in established strains, whereas it was lacking in hospital strains.

Keywords: *Staphylococcus aureus*, proliferation, hemolytic activity, circadian, ultradian rhythms

На современном этапе уделяется большое внимание изучению закономерностей осуществления процессов жизнедеятельности различных организмов во времени. Существование эндогенных циркадианных ритмов, наряду со стабильно выявляемыми ультрадианными циклическими процессами на всех уровнях организации эукариот, не вызывает сомнений. Исследования физиологических и онтогенетических процессов бактериальных клеток в масштабах физического времени, проведенные с целью обнаружения «биологических часов», отличаются разнообразием и разноречивостью выводов [4, 9, 11].

Бактериальная популяция рассматривается как морфологически и физиологически непрерывно изменяющаяся и саморегулирующаяся многоклеточная система, обладающая высоким приспособительным потенциалом, направленным на сохранение вида [2] и занимающая свой специфический пространственно-временной континуум. С этой точки зрения хронобиологический подход выступает одновременно и как методологический принцип и как методический прием [3].

Цель исследования – изучить особенности биологических свойств *S. aureus* в разное время суток.

Материалы и методы исследования

Материалом для исследования служили музейные штаммы: *S. aureus* ATCC № 25923 и *S. aureus* № 209-Р (НИИ стандартизации и контроля медицинских биологических препаратов имени Л.А. Тарасевича). В качестве госпитальных вариантов использовали изоляты, выделенные из клинического материала раневого отделяемого пациентов ожогового центра Областной клинической больницы г. Тюмени (*S. aureus* № 2888; № 2891; № 2305).

Выделение и идентификацию госпитальных штаммов *S. aureus* проводили в соответствии с приказом МЗ СССР № 535 от 22.04.85. Биоритмы пролиферативной активности микроорганизмов изучали по разработанной авторами методике проведения биоритмологического эксперимента и обработке данных, учитывающих особенности работы с микроорганизмами [7, 8]. Гемолитическую активность определяли по методике Бухарина О.В. [1].

Хронодизайн исследований подразумевал получение по каждой оцениваемой функции 8-ми измерений в сутки с 3–5-кратным повторением условий эксперимента. Данные были обработаны по методу наименьших квадратов (косинор-анализ) при заданной значимости достоверности $p < 0,05$ [10]. Поиск достоверных ритмов проведен линейно по периоду с шагом поиска 1 час в спектральном диапазоне 8–24 ч, где было выявлено три основных спектральных компонента с периодами $T = 8$, $T = 12$ и $T = 24$ часа. Для каждого штамма впоследствии

определены основные параметры ритмов с $T = 8$, $T = 12$ и $T = 24$ часа: МЕЗОР (M) – среднее значение гармонической кривой наилучшей аппроксимации функции (косинусоиды), амплитуда ритма (A) – расстояние от экстремума до МЕЗОРа и акрофаза(f) – момент времени ожидаемого экстремума функции.

Статистическую обработку материалов и графическое изображение результатов проводили с использованием программ: Primer of Biostatistics Version 4.03 by Stanton A. Glantz 1998, Microsoft Office Excel 2003. Достоверность различия сравниваемых выборок определяли непараметрическим методом статистической обработки: критерий Манна – Уитни (T) – для несвя-

занных выборок (опыт-контроль, музейные и госпитальные культуры). Анализируемые различия считали достоверными при $p < 0,05$. Для установления связи между параметрами использовали корреляционный анализ по Спирмену (метод ранговой корреляции).

Результаты исследования и их обсуждение

Результаты исследований выявили суточную динамику пролиферативной активности госпитальных изолятов и музейных штаммов *S. aureus* (табл. 1).

Таблица 1

Ритмометрические показатели пролиферативной активности госпитальных изолятов и музейных штаммов *S. aureus*

Номер штамма	Вклад ритма, %	Мезор ($M \pm m$), КОЕ/мл	Амплитуда, КОЕ/мл	Акрофаза
	24-часовой 12-часовой		24-часовой 12-часовой	24-часовой 12-часовой
ATCC 25923	56,1* 10,4	$204,4 \pm 3,8$	$39,8 \pm 5,9$ $16,9 \pm 3,4$	22 ч 21 мин 05 ч 45 мин
209-P	38,4* 8,0	$193,4 \pm 4,3$	$37,8 \pm 7,9$ $16,8 \pm 9,7$	22 ч 12 мин 10 ч 27 мин
2888	6,7 15,4	$157,6 \pm 2,9$	$27,0 \pm 17,2$ $41,8 \pm 16,4$	21 ч 33 мин 01 ч 33 мин
2891	13,4 17,8*	$172,2 \pm 2,9$	$22,6 \pm 9,7$ $25,4 \pm 8,9$	23 ч 18 мин 08 ч 09 мин
2305	10,9 44,0*	$187,2 \pm 3,5$	$20,5 \pm 5,2$ $31,4 \pm 3,9$	05 ч 51 мин 09 ч 16 мин

Примечание. * – ритм достоверен ($p < 0,05$).

Биоритмы пролиферативной активности госпитальных изолятов *S. aureus* были гетерогенны. Каждый из изолятов *S. aureus* 2305, 2888 и 2891 имел свой индивидуальный профиль ритма (рис. 1). Для *S. aureus* 2888 достоверным являлся период, близкий к 8-часовому – 74,6 % ($p < 0,05$). Выявление ультрадианного ритма с различными гармониками (12- и 8-часовые периоды) в хроно-

биологических исследованиях предполагает проявление нескольких акрофаз в течение суток. По всей видимости, ультрадианные ритмы, как ритмы с высокочастотными гармониками, для госпитальных изолятов имеют важное биологическое значение, так как определяют устойчивость к внешним воздействиям и способность к адаптивному ответу на периодические раздражители.

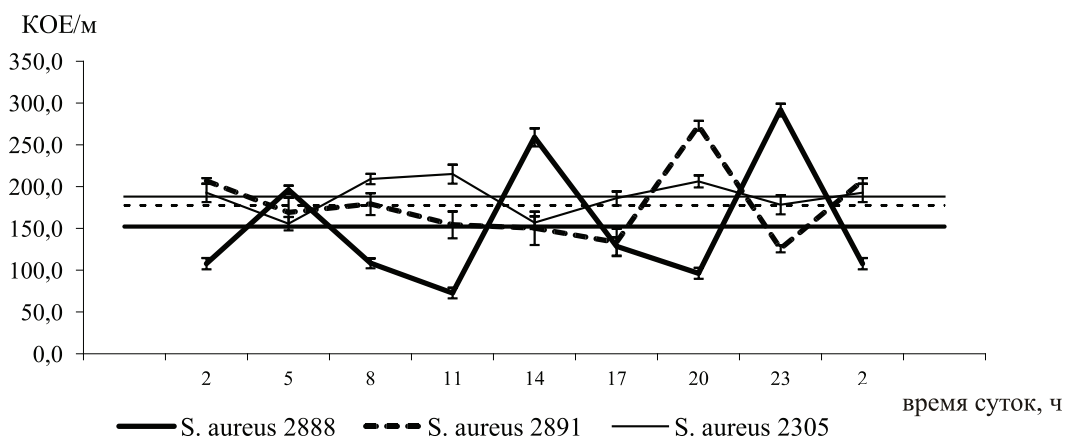


Рис. 1. Суточная динамика пролиферативной активности госпитальных изолятов *S. aureus*.

Примечание: по оси абсцисс – время суток, часы;
по оси ординат – количество колониеобразующих единиц на 1 мл (КОЕ/мл)

У музейных штаммов *S. aureus* 25923 и 209-Р ведущий – циркадианный (около-суточный) ритм пролиферативной активности ($p < 0,05$). Максимальные значения показателя наблюдались в вечернее и ночное время для обоих штаммов, минимальные – в утренние часы (рис. 2). Преобладание тех или иных гармоник в хроноинфраструктуре явно выражено и,

можно сказать, является типовым признаком изученных временных рядов пролиферативной активности данных штаммов. Достоверные отличия показателей вкладов ритмов в спектральном составе, амплитуды и акрофазы ритмов музейных штаммов от ритмометрических показателей госпитальных изолятов *S. aureus* могут быть использованы для их дифференциации.

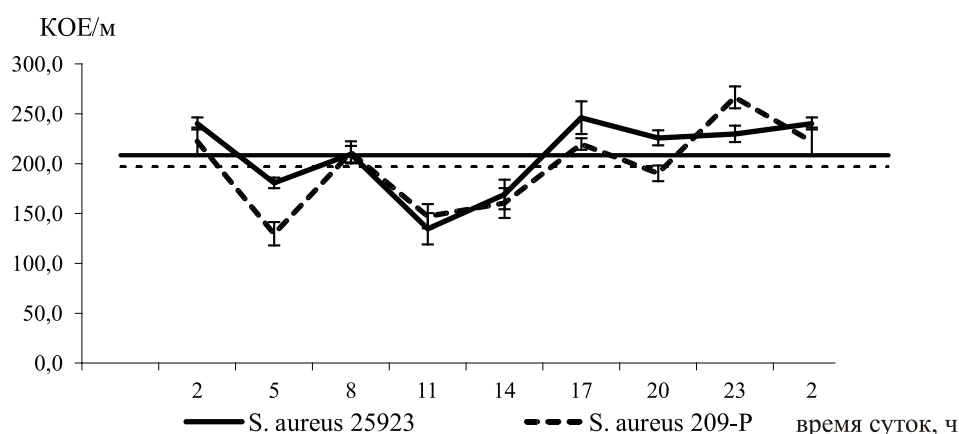


Рис. 2. Суточная динамика пролиферативной активности музейных штаммов *S. aureus*.

Примечание: по оси абсцисс – время суток, часы;
по оси ординат – количество колониеобразующих единиц на 1 мл (КОЕ/мл)

Исследования гемолитической активности музейных штаммов и госпитальных изолятов *S. aureus* в разное время суток позволили выявить динамику данного фактора

патогенности у изучаемых микроорганизмов в течение суток. Сравнительная характеристика ритмометрических показателей гемолитической активности представлена в табл. 2.

Таблица 2

Ритмометрические показатели гемолитической активности музейных штаммов и госпитальных изолятов *S. aureus*

Номер штамма	Вклад ритма, %	Мезор ($M \pm m$), %	Амплитуда, %	Акрофаза
	24-часовой 12-часовой		24-часовой 12-часовой	24-часовой 12-часовой
ATCC 25923	63,0* 30,7*	$14,7 \pm 0,1$	$5,0 \pm 0,9$ $3,8 \pm 3,8$	22 ч 46 мин 01 ч 13 мин
209-Р	72,1* 16,4	$22,4 \pm 0,1$	$4,8 \pm 0,7$ $1,4 \pm 1,2$	17 ч 35 мин 06 ч 55 мин
2888	31,9* 19,9*	$4,7 \pm 0,6$	$2,7 \pm 0,9$ $2,1 \pm 0,9$	03 ч 8 мин 02 ч 42 мин

Примечание. * $p < 0,05$ – достоверные вклады ритмов.

Гемолитическая активность музейного штамма *S. aureus* 25923 характеризовалась достоверным циркадианным ритмом и достигала максимума в 23.00, минимума – в раннее утреннее время – с 5.00 до 8.00 часов (рис. 3). У музейного штамма *S. aureus* 209-Р прослеживался достоверный циркадианный ритм с акрофазой в 17.00 часов (максимальные значения показателя – $30,6 \pm 0,2\%$).

Среднесуточный показатель гемолитической активности у музейных штаммов *S. aureus* был достоверно выше, в сравнении с госпитальным изолятом, ($T = 40$, $p < 0,05$ для штаммов 25923 и 2888; $T = 36$, $p < 0,05$ для штаммов 209 и 2888). Высокая амплитуда (как показатель стабильности ритма) также отмечалась у музейных штаммов *S. aureus*.

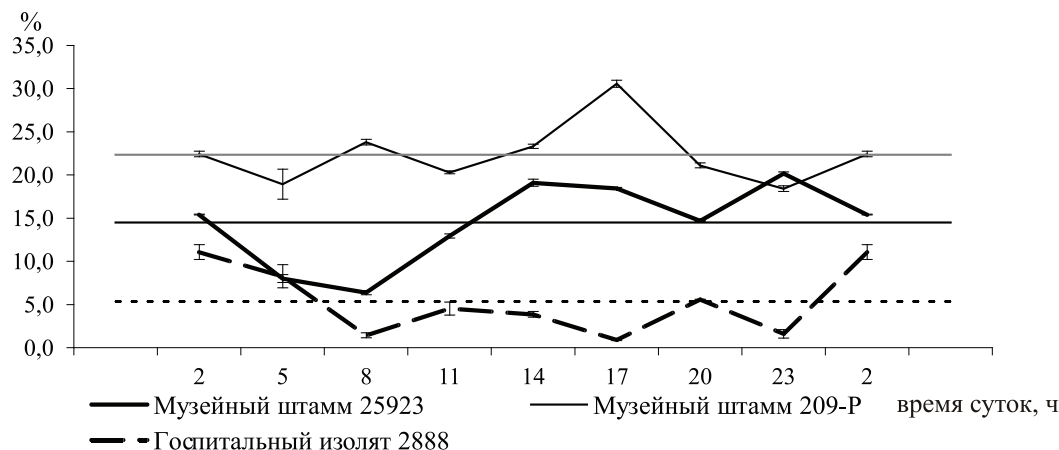


Рис. 3. Суточная динамика гемолитической активности *S. aureus*.

Примечание. По оси абсцисс – время суток, часы;
по оси ординат – гемолитическая активность, %

Госпитальный изолят *S. aureus* 2888 был типирован как негемолитический, однако, исследуя этот показатель в суточной динамике, мы установили, что у данного микроорганизма определялось наличие гемолизинов, причем в большей степени в ночное время – 02.00 часа ($11,1 \pm 0,1\%$). В утреннее и дневное время показатели гемолитической активности у госпитального изолята были настолько низкими (минимальные значения – $0,9 \pm 0,03\%$, $1,4 \pm 0,1\%$), что не могли быть определены традиционными методами (рис. 3).

Проведенный корреляционный анализ пролиферативной и гемолитической активности *S. aureus* показал положительную корреляцию между этими показателями у музейных штаммов (штамм 25923: $r = 0,36$; $p < 0,05$; штамм 209-P: $r = 0,29$; $p < 0,05$).

Таким образом, в результате исследований было выявлено наибольшее сходство между музейными штаммами *S. aureus* по пролиферативной и гемолитической активности. Для музейных штаммов выявлены преимущественно циркадианные ритмы изучаемых показателей. Для госпитальных изолятов микроорганизмов характерна гетерогенность биоритмов пролиферативной активности, сформировавшаяся, вероятно, под влиянием окружающей среды. Госпитальные изоляты *S. aureus* имели различный спектральный состав ритмов, не совпадающий с ритмами музейных штаммов. У госпитального изолята *S. aureus*, типированного как негемолитический вариант, выявлены циркадианные и ультрадианные ритмы с акрофазой в ночное время.

При сравнении суточной динамики пролиферативной и гемолитической активности изучаемых штаммов отметили, что с увеличением пролиферативной активнос-

сти наблюдалась максимальная продукция гемолизинов. У госпитальных изолятов не было выявлено четкой закономерности, хотя можно отметить, что в период минимальной пролиферативной активности наблюдался максимум активности гемолизинов.

Полученные данные могут свидетельствовать о различных суточных периодах физиологической активности микробных культур. Результаты исследований не противоречат существующему принципу попеременной (асинхронной) работы структур организма. Он справедлив для всего диапазона структурных уровней организма, начиная от системного и кончая молекулярным. Так, при интенсивном функционировании той или иной системы органов функциональная активность многих других систем снижается: в одной и той же клетке адаптивная интенсификация синтеза одних ферментов обязательно сопровождается ингибированием продукции других. Это свидетельствует о том, что организму свойственна способность экономии материальных ресурсов и максимальная концентрация их на главном участке развертывания приспособительной реакции в каждый данный момент [5, 6].

Выводы

1. Выявлены циркадианные ритмы пролиферативной и гемолитической активности у музейных штаммов и ультрадианные ритмы у госпитальных изолятов *S. aureus*, что имеет важное значение для адаптации патогена к меняющимся условиям внешней среды.

2. Хронобиологический подход позволил выявить генетически детерминированный признак – гемолитическую активность госпитального изолята *S. aureus*, типированного традиционным методом как гемолитически негативный вариант.

3. Установлена прямая корреляция между пролиферативной и гемолитической активностью музейных штаммов *S. aureus* и обратная корреляция у госпитального изолята.

4. Выявление суточной динамики биологических свойств определяет возможность нового подхода к изучению адаптивного потенциала микроорганизмов.

Список литературы

1. Бухарин О.В. Проблемы персистенции патогенов в инфектологии // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2006. – № 4. – С. 4–8.
2. Высоцкий В.В., Котлярова Г.А. Поли(гетеро)морфные формы патогенных бактерий в инфекционной патологии // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 1999. – № 2. – С. 100–104.
3. Губин Г.Д., Губин Д.Г. Хроном сердечно-сосудистой системы на различных этапах онтогенеза человека. – Тюмень, 2000. – 176 с.
4. Загускин С.Л. Временная организация и устойчивость биосистем // Проблема времени в культуре, философии и науке: Сб. науч. тр. / под ред. В.С. Чуракова. – Шахты: Изд-во ЮРГУЭС, 2006. – 155 с.
5. Комаров Ф.И., Рапопорт С.И. Хронобиология и хрономедицина. – М.: Триада-Х, 2000. – С. 9–24.
6. Лукомская К.А. Микробиология с основами вирусологии: учебн. пособие для пед. институтов по биол. и хим. специальностям. – М.: Просвещение, 1987. – 192 с.
7. Патент РФ на изобретение № 2285258 Способ диагностики госпитальных штаммов // Кашуба Э.А., Тимохина Т.Х., Курлович Н.А., Паромова Я.И., Варницына В.В., Холявина Р.М., Губин Д.Г., Козлов Л.Б. – 2006. – 11 с.
8. Тимохина Т.Х., Курлович Н.А., Паромова Я.И. и др. Биоритмы пролиферативной активности музейных и госпитальных штаммов микроорганизмов // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2007. – № 4. – С. 1–6.
9. Min H., Guo H., Xiong J. Department of Biology, Texas A&M University, College Station, USA, 2005. – P. 77843–77858.
10. Nelson W., Tong Y.L., Lee J.K., Halberg F. Methods for cosinorhythmometry // Chronobiologia. – 1979. – Vol. 6. N 4. – P. 305–323.
11. Soriano M.I., Roibas B., Garcia A.B., Espinosa-Urgel M.J. Evidence of circadian rhythms in non-photosynthetic bacteria? // J. Circadian Rhythms. – 2010. – 8:8 doi: 10.1186/1740-3391-8-8.

References

1. Buharin O.V. Problemi persistenzii patogenov v infektologii. *J. Microbiol. Epidemiol. Immunobiol.* 2006, no 4: pp. 4–8.
2. Vysotsky V.V., Kotlyarova G.A. Poly(gero)morphnyie formi patogennykh bakteriy v infektsionnoy patologii. *J. Microbiol. Epidemiol. Immunobiol.* 1999, no 2: pp. 100–104.
3. Gubin G.D., Gubin D.G. Chronome serdechno-sosyudistoi sistemi na razlichnykh etapah ontogeneza cheloveka [Cardiovascular system Chronomes at different stages of human ontogeny]. Tyumen, 2000. 176 p.
4. Zaguskin S.L. Vremennaya organizatsiya i ustoitichivost biosistem. (Temporal order and stability of biosystems, In: Problem of Time in culture, philosophy and science). Shakhity. URGUES, 2006, 155 p.
5. Komarov F.I., Rapoport S.I. Chronobiologia i Chronomedicina (Chrononobiology and Chronomedicine). Moscow, Triada, 2000, pp. 9–24.
6. Lukomskaya K.A. *Mikrobiologiya s osnovami virusologii* (Microbiology with bases of virology). Moscow. Prosveshchenie. 1987. 192 p.
7. RF Patent № 2285258 “Sposob diagnostiki gospitalnykh shtammov («A method for diagnosing hospital strains») // Kashuba E.A., Timohina T.Kh., Kurlovich N.A., Paromova Ya.I., Varnytsina V.V., Hohlyavina R.M., Gubin D.G., Kozlov L.B. 2006. 11 p.
8. Timohina T.Kh., Kurlovich N.A., Paromova Ya.I. et al. Bioritmi proliferativnoy aktivnosti muzeynykh i gospitalnykh shtammov mikroorganizmov. *J. Microbiol. Epidemiol. Immunobiol.* 2007, no 4: pp. 1–6.
9. Min H., Guo H., Xiong J. Department of Biology, Texas A&M University, College Station, USA, 2005. pp. 77843–77858.
10. Nelson W., Tong Y.L., Lee J.K., Halberg F. Methods for cosinorhythmometry // *Chronobiologia*. 1979. Vol. 6. no. 4. pp. 305–323.
11. Soriano M.I., Roibas B., Garcia A.B., Espinosa-Urgel M.J. Evidence of circadian rhythms in non-photosynthetic bacteria? // *J. Circadian Rhythms*, 2010. 8:8 doi: 10.1186/1740-3391-8-8.

Рецензенты:

Ральченко И.В., д.б.н., профессор, заведующая кафедрой фармацевтической технологии и фармакогнозии с курсом ботаники, ГБОУ ВПО ТюмГМА Минздрава России, г. Тюмень;

Жданова Е.В., д.м.н., доцент, заведующая кафедрой патологической физиологии, ГБОУ ВПО ТюмГМА Минздрава России, г. Тюмень.

Работа поступила в редакцию 15.07.2014.