

УДК 576.893.113 : 615.33

**ШТАММЫ CRITHIDIA ONCOPELTI (KINETOPLASTMONADA),
УСТОЙЧИВЫЕ К ЦИКЛОГЕКСИМИДУ И ХЛОРАМФЕНИКОЛУ**

А. Г. Самовар

При культивировании жгутиконосцев *Crithidia oncopelti* на средах с возрастающими концентрациями антибиотиков были получены штаммы критидий, устойчивые к 20, 50, 100 мкг/мл циклогексимида и к 2.5 мг/мл хлорамфеникола. Перекрестная устойчивость между полученными штаммами *C. oncopelti* отсутствовала. Резистентность штаммов, культивировавшихся на средах без ингибиторов, сохранялась в течение 12—38 пассажей или 50—160 клеточных генераций соответственно.

Образование устойчивых форм патогенных простейших к лекарственным препаратам ставит перед химиотерапией сложные проблемы. Поэтому исследование механизмов резистентности паразитических простейших к действию лекарственных веществ является важной задачей, от решения которой во многом зависит успех лечения протозойных заболеваний человека и животных. Однако исследователи, изучающие эту проблему, сталкиваются со значительными трудностями, связанными с тем, что паразитические простейшие обладают сложными жизненными циклами и многие из них плохо культивируются *in vitro*. Поэтому обоснованно стремление обойти указанные затруднения путем использования модельных объектов. Так, исследования механизмов действия трипанозидных веществ зачастую проводят на трипаносоматидах из рода *Crithidia*, в частности на *Crithidia oncopelti*, которые культивируются на аксеничных средах, давая биомассу, достаточную для различных исследований (Newton, 1962, 1967). *C. oncopelti* используется в качестве модельного объекта и для изучения механизмов резистентности к лекарственным веществам (Wallis, 1966).

Известно, что многие препараты, применяемые для химиотерапии трипаносомозов, ингибируют цитоплазматический белковый синтез в клетках паразитов (Chesters, 1966; Newton, 1967). Однако, как показывают исследования, кроме цитоплазматических рибосом, многие трипанозиды одновременно действуют и на другие внутриклеточные мишени (Williamson, 1979). Широкий спектр воздействия лекарственных веществ на клетки трипаносом затрудняет анализ механизмов их действия, а, следовательно, и исследование механизмов резистентности паразитов к этим препаратам. Представляется обоснованным использовать при изучении резистентности не только модельные организмы, но и «модельные» химические вещества, механизм действия которых на клетки сравнительно хорошо исследован и является достаточно специфичным.

Исходя из таких соображений, в качестве веществ, к которым мы получали резистентные штаммы критидий, были выбраны циклогексимид и хлорамфеникол. Механизмы действия этих антибиотиков специфичны и сравнительно полно изучены на различных клеточных системах, что позволяет их использовать в качестве инструментов ингибиторного анализа (Ашмарин, Ключарев, 1975).

Задачей настоящего исследования было получение устойчивых к циклогексимиду и хлорамфениколу форм *Crithidia oncopelti*, исследование степени наследуемости полученных признаков, а также проверка наличия перекрестной резистентности к этим антибиотикам.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Исследования выполнены в лаборатории протозоологии Зоологического института АН СССР. Аксеничная культура *S. oncopelti* была получена с кафедры молекулярной биологии Московского государственного университета от Г. Н. Зайцевой.¹

Культуры вели на жидкой казеинно-дрожжевой среде (Сухарева-Немакова и др., 1969) с некоторыми модификациями. Состав среды: KCl — 0.42 г, NaCl — 5 г, KH_2PO_4 — 0.272 г, Na_2HPO_4 — 2.6 г, глюкоза — 20 г, гидролизат казеина — 15 г, раствор микроэлементов (Newton, 1956) — 10 мл, вода дистиллированная — до 1 л. Среду нагревали до кипения и освобождали от осадка после центрифугирования (3000 об./мин, 20 мин), pH среды доводили до 7.5, используя 10 н NaOH или 10 н HCl. Стерилизацию среды проводили в автоклаве ГК-100-2, при режиме — давление 0.5 атм. в течение 30 мин.

Культуры критидий вели в пробирках, содержащих по 3 мл среды, при температуре 24—25° С. Пересадки на свежую среду производили через 6—7 сут. Посевная доза составляла $(1-1.5) \times 10^7$ клеток в 1 мл среды.

Устойчивость к циклогексимиду и хлорамфениколу вырабатывали посредством длительной селекции паразитов в средах с постепенно возрастающими концентрациями антибиотиков. Селекцию начинали в субингибиторных концентрациях: 0.25 мкг/мл циклогексимида и 25 мкг/мл хлорамфеникола. Доза засева в начале выработки устойчивости составляла 1.5×10^7 клеток в 1 мл среды. При достижении необходимых для исследования уровней резистентности пересадки проводили, засевая по 1×10^7 клеток в 1 мл среды. Густоту клеточных суспензий определяли путем подсчета в камере Горяева. Число клеточных делений и время генерации определяли по Перту (Перт, 1978).

Исходные растворы антибиотиков готовили следующим образом. Циклогексимид («Coch-Light») растворяли в стерильной дистиллированной воде и хранили в холодильнике при 4° С не более двух недель. Хлорамфеникол («Serva») растворяли в 70 %-ном этиловом спирте. Срок хранения в холодильнике при 4° С — не более одной недели. Нужные концентрации антибиотиков получали, добавляли исходные растворы в пробирки со средами непосредственно перед засевом культур. Раствор хлорамфеникола добавляли в среду с таким расчетом, чтобы конечная концентрация этилового спирта в культуральной среде не превышала 0.8 %. Этот уровень ингибитора не влиял на рост контрольных культур. Отмывку от антибиотиков производили три раза свежей средой с помощью центрифугирования (3000 об./мин, в течение 3 мин). Все опыты повторяли не менее 3 раз.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Устойчивость к концентрациям 20, 50 и 100 мкг/мл циклогексимида была получена при культивировании критидий в средах с возрастающими концентрациями антибиотика через 28, 34 и 39 пересевов или через 105, 125 и 145 клеточных генераций соответственно. Резистентности к 2.5 мг/мл хлорамфеникола клетки достигли через 44 пассажа (150 генераций) с начала селекции.

Путем одношаговой селекции получить устойчивые штаммы не удалось. Резистентность к циклогексимиду и хлорамфениколу развивалась градуально, в течение длительного времени.

На рис. 1 представлены кривые роста устойчивых и чувствительных штаммов *S. oncopelti* в средах с 20, 50 и 100 мкг/мл циклогексимида. Размножение чувствительных клеток в среде с концентрацией антибиотика 20 мкг/мл полностью ингибируется. Однако гибель критидий происходит только в среде с концентрацией ингибитора 100 мкг/мл и выше на 8—14-е сут с начала культивирования. В средах с 20 мкг/мл и 50 мкг/мл циклогексимида отдельные клетки сохраняют жизнеспособность. Эти данные получены из опытов, в которых чувствительные организмы, культивировавшиеся в средах с 20, 50, 100 мкг/мл циклогексимида, отмывались и пересевались в свежую среду без ингибитора.

¹ Пользуясь случаем, выражаем искреннюю признательность Г. Н. Зайцевой за любезно предоставленную нам культуру.

Жгутиконосцы, росшие в среде с 20 и 50 мкг/мл антибиотика, давали рост на свежей среде после отмывки, а критидии из пробирок с концентрацией 100 мкг/мл после отмывки и пересадки в свежую среду никакого роста не давали.

Размножение клеток устойчивых штаммов *C. oncopelti* на средах с соответствующими концентрациями циклогексимида подавлялось незначительно по сравнению с размножением клеток исходного чувствительного штамма в среде без антибиотика (рис. 1). Генерационное время (g) составило: для штамма, резистентного к 20 мкг/мл циклогексимида (Chx^{R20}), — 34.9 ч, для штамма, резистентного к 50 мкг/мл циклогексимида (Chx^{R50}), — 36.0 ч, для штамма, рези-

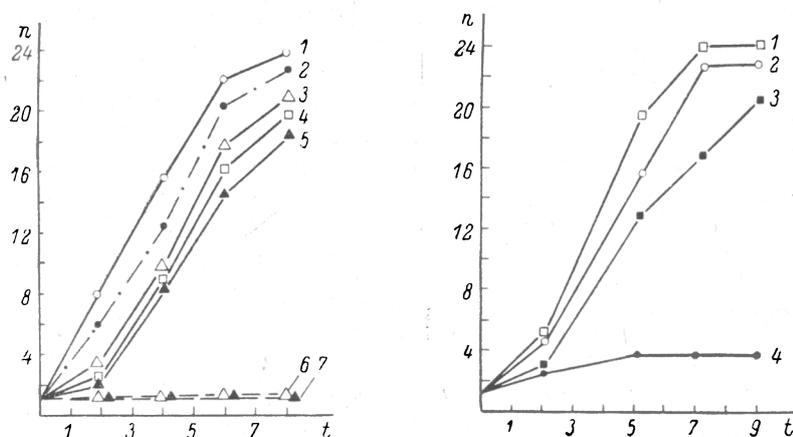


Рис. 1. Кривые роста чувствительного (СОМ) и резистентных к циклогексимиду (Chx^{R20} , Chx^{R50} , Chx^{R100}) штаммов *C. oncopelti*.

1 — Chx^{R100} на среде без циклогексимида; 2 — СОМ на среде без циклогексимида; 3 — Chx^{R20} на среде с концентрацией циклогексимида 20 мкг/мл; 4 — Chx^{R50} на среде с концентрацией циклогексимида 50 мкг/мл; 5 — Chx^{R100} на среде с концентрацией циклогексимида 100 мкг/мл; 6 — СОМ на среде с концентрацией циклогексимида 20 мкг/мл; 7 — СОМ на среде с концентрацией циклогексимида 100 мкг/мл. По оси ординат — число клеток в 1 мл среды (n) $\times 10^7$. По оси абсцисс — время культивирования (t) в сутках.

Рис. 2. Кривые роста чувствительного (СОМ) и резистентного к хлорамфениколу ($Cap^{R2.5}$) штаммов *C. oncopelti*.

1 — $Cap^{R2.5}$ на среде без хлорамфеникола; 2 — СОМ на среде без хлорамфеникола; 3 — $Cap^{R2.5}$ на среде с 2.5 мг/мл хлорамфеникола; 4 — СОМ на среде с 2.5 мг/мл хлорамфеникола. По оси ординат — число клеток в одном мл среды (n) $\times 10^7$. По оси абсцисс — время культивирования (t) в сутках.

стентного к 100 мкг/мл циклогексимида (Chx^{R100}), — 37.9 ч, для чувствительного штамма (СОМ) на среде без антибиотика — 33.5 ч.

После отмывки и пересадки резистентных штаммов в свободную от ингибитора среду их скорость роста превышала скорость роста чувствительных клеток, соответственно было меньшим и генерационное время — 29.9 ч.

В среде с 2.5 мг/мл хлорамфеникола жгутиконосцы чувствительного штамма не погибали, но их размножение полностью подавлялось на 2—4-е сут культивирования. Рост устойчивого к 2.5 мг/мл хлорамфеникола штамма *C. oncopelti* ($Cap^{R2.5}$) ингибировался в среде с этим антибиотиком (рис. 2). Генерационное время резистентного и чувствительного штаммов составило 37.8 и 33.8 ч соответственно. На среде без хлорамфеникола генерационное время штамма $Cap^{R2.5}$ было ниже, чем чувствительного (31.7 и 33.8 ч соответственно).

Чтобы определить наследуемость полученных признаков, штаммы Chx^{R20} , Chx^{R50} , Chx^{R100} , $Cap^{R2.5}$ выращивали на средах без ингибиторов в течение 38, 28, 19 и 12 пересевов или 160, 120, 80 и 50 клеточных поколений соответственно. Затем их тестировали в соответствующих концентрациях циклогексимида или хлорамфеникола. Характер роста тестируемых штаммов существенно не изменился по сравнению с ростом этих же штаммов, но культивировавшихся все время на средах с антибиотиками.

Для проверки возможного наличия перекрестной устойчивости из полученных резистентных штаммов были выбраны Chx^{R100} и $Cap^{R2.5}$, так как значения генерационного времени у этих штаммов при культивировании на средах с соответствующими антибиотиками наиболее близки ($g=37.9$, $g=37.8$ соответ-

ственно). При пересадке критидий, устойчивых к хлорамфениколу ($Cap^{R2.5}$), на среду с циклогексимидом их рост ингибировался и клетки погибали так же, как и клетки чувствительного штамма. Аналогичная картина наблюдалась при засеве жгутиконосцев штамма Chx^{R100} на среду с хлорамфениколом: паразиты ингибировались антибиотиком так же, как и исходный штамм SOM (рис. 3). Полученные результаты свидетельствуют об отсутствии перекрестной устойчивости у штаммов Chx^{R100} , $Cap^{R2.5}$ к циклогексимиду и хлорамфениколу.

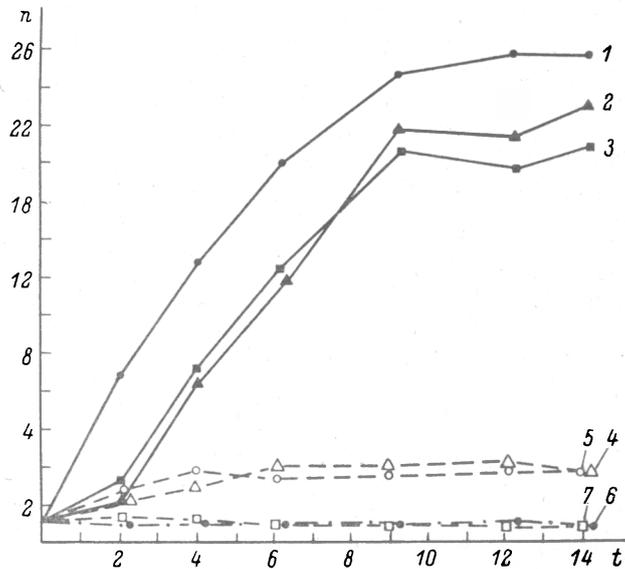


Рис. 3. Отсутствие перекрестной устойчивости к циклогексимиду и хлорамфениколу у штаммов $Cap^{R2.5}$ и Chx^{R100} *C. oncopelti*.

1 — SOM на среде без антибиотиков; 2 — Chx^{R100} на среде с концентрацией циклогексимида 100 мкг/мл; 3 — $Cap^{R2.5}$ на среде с концентрацией хлорамфеникола 2.5 мг/мл; 4 — Chx^{R100} на среде с концентрацией хлорамфеникола 2.5 мг/мл; 5 — SOM на среде с концентрацией хлорамфеникола 2.5 мг/мл; 6 — SOM на среде с концентрацией циклогексимида 100 мкг/мл; 7 — $Cap^{R2.5}$ на среде с концентрацией циклогексимида 100 мкг/мл. По оси ординат — число клеток в 1 мл среды (n) $\times 10^7$. По оси абсцисс — время культивирования (t) в сутках.

ОБСУЖДЕНИЕ

Сохранение устойчивости к циклогексимиду и хлорамфениколу в течение многих клеточных генераций у резистентных штаммов *C. oncopelti* (Chx^{R20} , Chx^{R50} , Chx^{R100} , $Cap^{R2.5}$) при культивировании их на средах без ингибиторов свидетельствует о наследственной природе полученных признаков.

Резистентность к 20, 50, 100 мкг/мл циклогексимида и к 2.5 мг/мл хлорамфеникола у критидий развивалась постепенно, начиная с субингибиторных доз антибиотиков. Так как попытки получить устойчивые штаммы к этим же концентрациям антибиотиков посредством одношаговой селекции оказались безуспешными, то можно предположить полигенную природу резистентности у полученных штаммов. Данное предположение подтверждает также то, что резистентные фенотипы специфичны к антибиотикам (отсутствует перекрестная устойчивость к циклогексимиду и хлорамфениколу), редки в исходной культуре (резистентность развивалась постепенно в течение длительного времени) и стабильны на протяжении большого числа клеточных генераций при культивировании резистентных штаммов в отсутствие антибиотиков. Поэтому представляется маловероятной возможность того, что рассматриваемые признаки являются результатом длительных модификаций или эпигеномной изменчивости, хотя нельзя и полностью исключить такую возможность.

Отсутствие перекрестной устойчивости у штаммов Chx^{R100} и $Cap^{R2.5}$ свидетельствует о различии механизмов резистентности критидий к циклогексимиду и хлорамфениколу и об их специфичности. Полученные результаты согласуются с литературными данными. Известно, что циклогексимид подавляет белковый синтез на 80 S рибосомах и неэффективен по отношению к митохон-

дриальным рибосомам (Ашмарин, Ключарев, 1975; Vazkuez, 1979). Хлорамфеникол, напротив, является ингибитором митохондриального синтеза белка у эукариот и не действует на цитоплазматические рибосомы (Ашмарин, Ключарев, 1975). Таков же характер действия этих антибиотиков и на клетки *C. oncopelti* (Chesters, 1966; Cross, 1966; Зайцева и др., 1971; Сыромятников и др., 1973).

О механизмах резистентности эукариотных клеток к циклогексимиду известно, что они связаны с изменением большой субъединицы (60 S) цитоплазматических рибосом (Pöche e. a. 1979; Chisholm, Vaughan, 1979), хотя у *Tetrahymena thermophila* резистентность может ассоциироваться и с малой субъединицей (40 S) (Sutton e. a., 1979).

Резистентность клеток эукариотов к хлорамфениколу по общепринятой точке зрения имеет митохондриальную природу (Ашмарин, Ключарев, 1975), что убедительно показано в опытах по пересадке и гибридизации митохондрий на дрожжах и инфузориях (Beale e. a., 1972; Thomas, Wilkie, 1968).

Таким образом, можно предположить, что отсутствие перекрестной устойчивости у полученных штаммов *C. oncopelti* свидетельствует о наличии у них типичных механизмов резистентности к хлорамфениколу и циклогексимиду. Несомненно, это предположение, как и высказанное предположение о природе наследственности полученных признаков резистентности, требует проверки и подтверждения в дальнейших исследованиях.

Литература

- Ашмарин И. П., Ключарев Л. А. Ингибиторы синтеза белка. Л., Медицина, 1975. 207 с.
- Зайцева Г. Н., Чугунов В. А., Ширшов А. Т. Действие антибиотиков на белоксинтезирующие системы кинетопласта и цитоплазмы зоофлагеллята *Strigomonas oncopelti*. — ДАН СССР, 1971, т. 198, № 6, с. 1461—1464.
- Перт С. Дж. Основы культивирования микроорганизмов и клеток. М., Мир, 1978. 331 с.
- Сухарева-Немакова Н. Н., Зеленева Р. Н., Силаев А. Б., Дороница Л. А. Глубинное культивирование *Strigomonas oncopelti*. — Вест. МГУ, серия биол., 1969, № 3, с. 3—9.
- Сыромятников Е. Ю., Ширшов А. Т., Зайцева Г. Н. Функциональные особенности белоксинтезирующей системы кинетопластов *Strigomonas oncopelti*. — Биохимия, 1973, т. 38, вып. 3, с. 471—477.
- Beale G. H., Knowles J. K. C., Tait A. Mitochondrial genetics in *Paramecium*. — Nature, 1972, vol. 235, N 5338, p. 396—397.
- Chesters J. K. Protein synthesis by cell-free extracts of *Critidia oncopelti*. — Bioch. Bioph. Acta., 1966, vol. 114, p. 385—397.
- Chisholm G. E., Vaughan M. H. Isolation and characterization of a cycloheximide-resistant mutant of *Acanthamoeba castellanii* Neff. — J. Bacteriol., 1979, vol. 138, N 1, p. 280—283.
- Cross G. A. M. Protein synthesis in a cell-free system from *Crithidia oncopelti*. — J. Gen. Microbiol., 1966, vol. 44, N 1, p. 3—4.
- Newton B. A. A synthetic growth medium for the trypanosomid flagellate *Strigomonas (Herpetomonas) oncopelti*. — Nature, 1956, vol. 177, p. 279—280.
- Newton B. A. The effect of quaternary ammonium trypanocides on cell division, nucleic acid and protein synthesis. — In: Drugs, Parasites and Hosts. London, Churchill, 1962, p. 142—160.
- Newton B. A. Trypanocidal and antimalarial drugs as inhibitors of nucleic acid and protein synthesis. — Parasitology, 1967, vol. 57, N 4, 1p—3p.
- Pöche H., Zakrewsky S., Nierhans K. H. Resistance against cyclogeximide in cell lines from chinese hamster and human cells is conferred by the large subunit of cytoplasmic ribosomes. — Mol. Gen. Genet., 1979, vol. 175, N 2, p. 181—185.
- Sutton C. A., Areas M., Hallberg R. L. Cyclogeximide resistance can be mediated through either ribosomal subunit. — Proc. Nat. Acad. Sci. (USA), 1979, vol. 75, N 7, p. 3158—3162.
- Thomas D. Y., Wilkie D. Recombination of mitochondrial drug resistance factors in *Saccharomyces cerevisiae*. — Bioch. Biophys. Res. Commun., 1968, vol. 30, p. 368—372.
- Vazquez D. Inhibitors of protein synthesis. — In: Molecular biology, biochemistry and biophysics. Berlin—Heidelberg—N. Y., Springer, 1979, vol. 30, p. 155—158.
- Wallis O. C. Pentamidine resistance in the parasitic flagellate *Crithidia (Strigomonas) oncopelti*. — J. Protozool., 1966, vol. 13, N 2, p. 230—234.
- Williams J. Effects of trypanocides on the fine structure of target organisms. Pharm. and Ther., 1979, vol. 7, N 3, p. 445—512.

Всесоюзный научно-исследовательский ветеринарный институт птицеводства и Зоологический институт АН СССР, Ленинград

Поступило 5 XII 1983

STRAINS OF CRITHIDA ONCOPELTI (KINETOPLASTMONADA) RESISTANT TO
CYCLOHEXIMIDE AND CHLORAMPHENICOL

A. G. Samovar

SUMMARY

By gradual (during several months) increase of the concentrations of cycloheximide (C) and chloramphenicol (Ch) in cultural medium there were obtained strains of *C. oncopelti* resistant to the effect of 20, 50, 100 mkg/ml and 2.5 mg/ml Ch. During 38, 28, 19 and 12 subculturings (that corresponds to 160, 120, 80 and 50 cell generations, respectively) on media without inhibitors parasites preserve their resistance to corresponding concentrations of C and Ch without essential changes. Cross resistance between obtained strains of *Crithidia* was missing. Therefore, the characters of resistance to C and Ch are rather specific, genetically specified and can be used as genetical markers.
