© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2025

УДК 579.861.2
DOI 10.59598/ME-2305-6053-2025-115-2-128-136

И. А. Кадырова[1], У. Г. Батенова[1*], А. В. Лавриненко[1], И. А. Беляев[1], Г. А. Атажанова[2], Я. К. Левая[2]

ОЦЕНКА ДИНАМИКИ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ MECA И YYCFG У МЕТИЦИЛЛИНРЕЗИСТЕНТНОГО ЗОЛОТИСТОГО СТАФИЛОКОККА (*MRSA*) ПРИ ВЛИЯНИИ ФЕНОЛЬНЫХ СОЕДИНЕНИЙ, БОРНЕОЛА И ЭКСТРАКТА, ВЫДЕЛЕННОГО ИЗ ШАЛФЕЯ СТЕПНОГО (SALVIA STEPPOSA DES.-SHOST)

[1]Научно-исследовательская лаборатория НАО «Карагандинский медицинский университет» (100008, Республика Казахстан, г. Караганда, ул. Гоголя, 40; e-mail: info@qmu.kz)
[2]Школа фармации НАО «Карагандинский медицинский университет» (100008, Республика Казахстан, г. Караганда, ул. Гоголя, 40; e-mail: info@qmu.kz)

***Алтын Дуйсенкызы Бакенова** – Научно-исследовательская лаборатория НАО «Карагандинский медицинский университет» (100008, Республика Казахстан, г. Караганда, ул. Гоголя, 40; e-mail: bakenovaa02@gmail.com)

Введение. Staphylococcus aureus демонстрирует достаточный адаптивный потенциал в условиях внешнего стресса, что может обусловливать его ключевую роль в этиологии внутрибольничных инфекций. Наблюдаемый экспоненциальный рост штаммов с множественной антибиотикорезистентностью за последние десятилетия свидетельствует о том, что механизмы адаптации способствуют выживанию и распространению *S. aureus* в условиях интенсивного госпитального воздействия антимикробных средств. Такой феномен существенно осложняет клиническое лечение инфекций и представляет серьезную угрозу для системы здравоохранения. Несмотря на активное изучение изменений в активности генов, связанных с антибиотикорезистентностью в разных стрессовых условиях, роль фенольных соединений в регуляции экспрессии генов у MRSA исследована недостаточно. В частности, практически отсутствуют данные о влиянии фенольных соединений и борнеола на экспрессию генов MecA и YycFG, что определяет актуальность данной работы.

Цель. Оценка динамики экспрессии генов MecA и YycFG у метициллинрезистентного золотистого стафилококка *(MRSA*) при влиянии фенольных соединений (розмариновая, хлорогеновая и феруловая кислоты), борнеола и экстракта листьев шалфея степного

Материалы и методы. Микрометодом серийных разведений были определены минимальные подавляющие концентрации исследуемых соединений. Для оценки влияния исследуемых соединений суточные культуры *MRSA* дополнительно инкубировалась с исследуемыми соединениями в субингибиторных концентрациях (1/2 МПК) 4 ч. Изменения экспрессии MecA и YycFG анализировали методом количественной ПЦР (ΔΔCt, log2 Fold Change). Экспрессию GyrB оценивали в качестве эндогенного контроля. Статистическая обработка включала в себя критерии Крускала – Уоллиса, Вилкоксона и Манна – Уитни (p=0,05).

Результаты и обсуждение. Фенольные соединения, борнеол и экстракт листьев шалфея степного снижали экспрессию MecA в 2,17 – 5 раз (p=0,043) и повышали YycFG в 1,84 – 2,45 раза (p=0,043). Наибольшую активность в отношении MecA проявили розмариновая и хлорогеновая кислоты.

Выводы. Хлорогеновая и розмариновая кислоты обладают значительным потенциалом для подавления экспрессии MecA у *MRSA*. Розмариновая кислота уменьшает экспрессию MecA в 5 раз, хлорогеновая кислота – в 4 раза. Результаты позволяют рассматривать изучаемые соединения в качестве многообещающих кандидатов для разработки новых антимикробных препаратов или адъювантов, усиливающих действие антибиотиков. В дальнейшем синергетическое сочетание розмариновой и хлорогеновой кислот с β-лактамами может стать эффективным инструментом для преодоления устойчивости *MRSA*.

Ключевые слова: MRSA; экспрессия генов; кПЦР; ген MecA; ген YycFG; фенольные соединения; борнеол; экстракт шалфея степного

ВВЕДЕНИЕ

Staphylococcus aureus (*S. aureus*) – один из ключевых грамположительных микроорганизмов, способный быть причиной различных инфекции, начиная от заболеваний инфекций мягких тканей и заканчивая системными заболеваниям, даже сепсисом [1]. Особую угрозу представляют метициллинрезистентные штаммы золотистого стафилококка (methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (*MRSA*), устойчивые к β-лактамным антибиотикам. В соответствии с последним отчетом, опубликованным 25 марта 2024 г. Центром по контролю и профилактике заболеваний и посвященным угрозам устойчивости к антибиотикам, за 2019 г. было зарегистрировано около 325 000 случаев госпитализации пациентов с инфекциями, вызванными *MRSA*. Из них около 10 600 случаев завершились летальным ис-

ходом. Экономические последствия данной проблемы также весьма значительны: в 2017 г. расходы на лечение инфекций, вызванных *MRSA*, составили порядка 1,7 миллиардов долларов США [2]. В Казахстане в 2018-2020 гг. распространнность *MRSA* среди взрослых составляет 12.5% [3].

Ключевым механизмом устойчивости *MRSA* является экспрессия гена MecA, кодирующего белок PBP2a, который замещает функцию пенициллинсвязывающих белков (PBPs), сохраняя синтез пептидогликана даже в присутствии β-лактамов [4].

Также резистентность *MRSA* может быть связана с образованием биоплтнок и активацией стрессовых ответов, что затрудняет терапию [5]. Изучение регуляции генов, таких как MecA, и компонентов двухкомпонентных систем (например, YycFG) критически важно для разработки новых стратегий борьбы с устойчивостью. Двухкомпонентная система YycFG (также известная как WalKR) играет ключевую роль в поддержании клеточного гомеостаза, регуляции биосинтеза клеточной стенки и формировании биопленок. YycG (сенсорная киназа) и YycF (регулятор ответа) контролируют экспрессию генов, связанных с синтезом полисахаридного межклеточного адгезина (PIA) через активацию icaADBC-локуса. Мутации в YycFG прямо или косвенно коррелируют с устойчивостью к ванкомицину и даптомицину (влияя на активность аутолизинов (пептидогликан-гидролаз)), оксациллину (регулируя PBPs и целостность клеточной стенки), гентамицину (участие в формировании персистерных клеток), ципрофлоксацину (стрессовый ответ через sarA), левофлоксацину (активация репарации ДНК) и эритромицину (возможная регуляция насосов оттока), что подчеркивает их роль в адаптации к антимикробным препаратам [6, 7].

Пристальное внимание исследователей направлено на анализ изменений активности генов, связанных с устойчивостью к антибиотикам в условиях стресса. Это объясняется тем, что стрессовая среда (например, антимикробные препараты, высокие или низкие температуры, pH, ультразвук или ультрафиолет) часто служат триггером для мутации или активации защитных систем микроорганизмов. Подобные стрессоры способны модифицировать метаболизм бактерий, стимулировать экспрессию специфических генов и тем самым повышать их выживаемость в неблагоприятных условиях [8].

Хотя регуляция генов *S. aureus* в ответ на различные факторы окружающей среды изучена достаточно широко, вопрос о том, использует ли этот микроорганизм фенольные соединения как сигнал для регуляции экспрессии генов, остается мало исследованным. На сегодняшний день известно, что выделенные фенольные соединения, такие как розмариновая, хлорогеновая и феруловая кислоты, являющиеся основными фенольными соединениями экстракта листьев шалфея степного, проявляют антибактериальный эффект, однако в литературных источниках практически нет работ, посвященных влиянию этих веществ на экспрессию генов MecA и YycFG у *MRSA* что представляет собой значительный пробел в знаниях [9, 10, 11, 12, 13, 14].

Виды рода *Salvia* (шалфей) проявляют широкий спектр биологической активности, включая антимикробное, антиоксидантное, противовоспалительное, антидиабетическое и цитотоксическое действие. В настоящее время исследования шалфея в значительной степени сосредоточены на изучении химического состава и биологической активности его эфирных масел. Однако возрастающий научный интерес привлекают гидрофильные и другие биологически активные компоненты, обладающие значительным фармакологическим потенциалом [9].

Розмариновая кислота демонстрирует синергетическое антимикробное действие в сочетании с офлоксацином, амоксициллином и ванкомицином против *Staphylococcus aureus*, а также с ванкомицином против *MRSA* [10]. Кроме того, розмариновая кислота снижает экспрессию генов вирулентности ahyB, aerA, lip и ahh1 у *Aeromonas hydrophila*, что свидетельствует о ее антивирулентном эффекте [11].

Феруловая кислота проявляет выраженную антибиопленочную активность в отношении *Shigella flexneri*, ингибируя формирование биопленки, разрушая клеточную мембрану и изменяя экспрессию генов. В частности, установлено, что феруловая кислота модулирует экспрессию 702 дифференциально экспрессируемых генов в биопленке *Shigella flexneri*, повышая экспрессию 169 генов и подавляя 533 гена по сравнению с интактной биопленкой [12].

Хлорогеновая кислота ингибирует экспрессию генов вирулентности hla, sea и agr у *S. aureus*, что может способствовать снижению патогенности данного микроорганизма [13].

Борнеол, в свою очередь, усиливает антибиотическую активность ципрофлоксацина и гентамицина против *S. aureus*, а также ингибирует рост *Escherichia coli*, что подтверждает его потенциал в качестве адъюванта антибактериальной терапии [14].

Таким образом, изучение биологической активности фенольных соединений видов рода *Salvia* представляет значительный интерес с точки зрения разработки новых терапевтических стратегий, направленных на борьбу с резистентными штаммами микроорганизмов.

Целью работы явилась оценка динамики экспрессии генов MecA и YycFG у метициллинрезистентного золотистого стафилококка *(MRSA)* при влиянии фенольных соединений (розмариновая, хлорогеновая и феруловая кислоты), борнеола и экстракта листьев шалфея степного (*Salvia stepposa Des.-Shost*).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование проводилось на 4 штаммах *MRSA*, выделенных из носа и глотки в 2023 г., на базе Научно-исследовательской лаборатории НАО «Карагандинский медицинский университет». Для детекции генов MecA, YycFG и Gyr B в эксперименте участвовали штаммы, устойчивые к β-лактамным антибиотикам и фторхинолонам. Штаммы были идентифицированы методами MALDI-TOF MS масс-спектрометрии (Microflex-LT, Biotyper System, Bruker Daltonics, Бремен,

Германия). Данные о чувствительности штаммов были взяты из базы данных Whonet версии 5.6. Штаммы MRSA выращивали в среде Мюллера-Хинтона при температуре 37 °C.

В исследованиях были использованы борнеол и экстракт, выделенный из листьев Шалфея степного (Salvia stepposa) и стандартные образцы фенольных соединений – розмариновая кислота, хлорогеновая кислота, феруловая кислота. Все соединения были растворены в 70% этаноле, был подготовлен 40% этаноловый экстракт шалфея степного. Использование 40% и 70% этанола обусловлено необходимостью обеспечения оптимальной растворимости фенольных соединений, обладающих разной степенью полярности. По данным Я. К. Левой оптимальным экстрагентом для шалфея степного (Salvia stepposa Des.-Shost) является 40% и 70% этиловый спирт. Последующее возрастание концентрации этилового спирта приводит к понижению коэффициента поглощения и выхода экстрактивных веществ [9]. По этой причине использование 40% и 70% этанола в качестве растворителя не являлось конфаундер-фактором в данном исследовании.

Согласно ISO 20776-1:2019 микрометодом серийных разведений на бульоне Мюллера – Хинтона были определены минимальные подавляющие концентрации (МПК) всех препаратов [15].

Суточную культуру MRSA в бульоне Мюллера – Хинтона инкубировали с фенольными соединениями, борнеолом и экстрактом шалфея степного в субингибиторных концентрациях (1/2 МПК) в течение 4 ч [16]. Далее культура клеток была промыта фосфатным буфером (PBS) для удаления остатков фенола и других химических веществ, которые могут оставаться в культуре клеток.

Далее общая РНК была выделена с помощью набора Aurum™ Total RNA Mini Kit (Bio-Rad, Франция) в соответствии со спин-протоколом для бактерии от производителя. Концентрацию РНК и целостность (RIN) оценивали на спектрофотометре Nano Photometer P330 (IMPLEN). Полученные концентрации РНК разбавляли до одинаковой концентрации контрольной группы. Далее из полученной РНК синтезировали кДНК набором High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems by Thermo Fisher Scientific, США). Количественную ПЦР проводили с помощью TaqMan™ Gene Expression Assay на системе Applied Biosystems QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific, США). Каждая реакционная смесь состояла из 5 мкл Master Mix (2x), 1 млк кДНК, 0,5 мкл праймера и 3,5 мкл безнуклеазной воды. Общий объем реакции 10 мкл. В соответствии с инструкцией производителя протокол кПЦР состоял из следующих этапов: инкубации uracil-N-glucosylase (1 цикл, 2 мин при 50 °C), активации полимеразы (1 цикл, 10 мин при 95 °C), денатурации (40 циклов по 15 с при 95 °C) и отжига/удлинения (40 циклов по 1 мин при 60 °C). Флуоресценцию регистрировали в конце каждого цикла (40 циклов). Затем была построена кривая плавления для подтверждения специфичности продуктов ПЦР. Количественную оценку проводили с помощью программного обеспечения Design and Analysis 2 (DA2, Thermo Fisher Scientific, США) с последующим анализом полученных данных методом ΔΔCt. Кратность изменения экспрессии (NRQ) рассчитывали по формуле

$$(1 + E)^{(-\Delta\Delta Ct)} \quad (1),$$

где E – эффективность амплификации, ΔΔCt – экспрессия гена-мишени [17].

Кратность изменения экспрессии расчитывалась по формуле

$$2^{(-\Delta\Delta Ct)} \quad (2),$$

так как E=1 (100%).

Экспрессию гена Gyr B оценивали в качестве эндогенного контроля [18]. Значения экспрессии ΔΔCt были трансформированы методом log 2 Fold Change, значения экспрессии генов участников контрольной группы были приняты за базовую точку.

Статистический анализ был выполнен в онлайн-калькуляторе statisty.app [19]. Был использован критерий Крускала – Уоллиса с поправкой Банферони для множественных сравнений, критерий Вилкоксона и U-критерий Манна – Уитни. Уровень значимости – 0,05.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Микрометодом серийных разведений на бульоне Мюллера – Хинтона были определены МПК розмариновой кислоты (МПК=12,8 мг/мл), хлорогеновой кислоты (МПК=20,48 мг/мл), феруловой кислоты (МПК=5,6 мг/мл), борнеола (МПК=8,188 мг/мл) и экстракта шалфея степного(МПК=25 мг/мл).

По данным анализа методом ΔΔCt было выявлено, что: розмариновая кислота и хлорогеновая кислота увеличили экспрессию гена MecA у 1 штамма и уменьшили экспрессию у 3 штаммов, увеличили экспрессию гена YycFG у всех 4 штаммов. Ферулловая кислота, борнеол и экстракт шалфея степного увеличили экспрессию гена MecA у 2 штаммов и уменьшили экспрессию 2 штаммов. Ферулловая кислота и борнеол увеличили экспрессию гена YycFG во всех 4 штаммах. Экстракт шалфея степного увеличил экспрессию гена YycFG у 3 штаммов и уменьшил экспрессию у 1 штамма (рис. 1).

Значения экспрессии ΔΔCt были трансформированы методом log 2 Fold Change, значения экспрессии генов контрольной группы были приняты за базовую точку (табл. 1, рис. 2).

Для MecA log 2 FC составил -2,322 при воздействии розмариновой кислоты; -2 при воздействии хлорогеновой кислоты; -1,358 при воздействии феруловой кислоты; -1,12 при воздействии борнеола и -1,515 при воздействии экстракта шалфея степного (p=0,601).

Для YycFG log 2 FC составил 1,19 при воздействии розмариновой кислоты; 0,993 при воздействии хлорогеновой кислоты; 1,293 при воздействии феруловой кислоты; 0,91 при воздействии борнеола и 0,88 при воздействии экстракта шалфея степного (p=0,158).

Отрицательные значения log 2 FC гена MecA и положительные значения log 2 FC гена YycFG означает снижение экспрессии гена MecA и увеличение гена YycFG при воздействии всех фенольных соединений и экстракта шалфея степного.

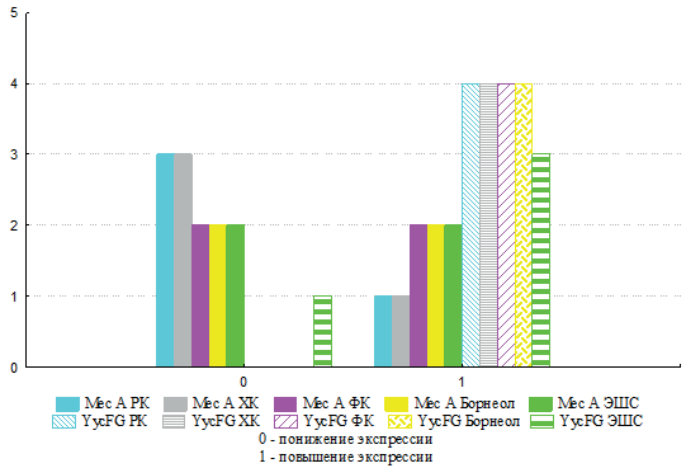

Рисунок 1 – Результаты экспрессии генов MecA и YycFG у *MRSA* при воздействии фенольных соединений, борнеола и экстракта шалфея степного

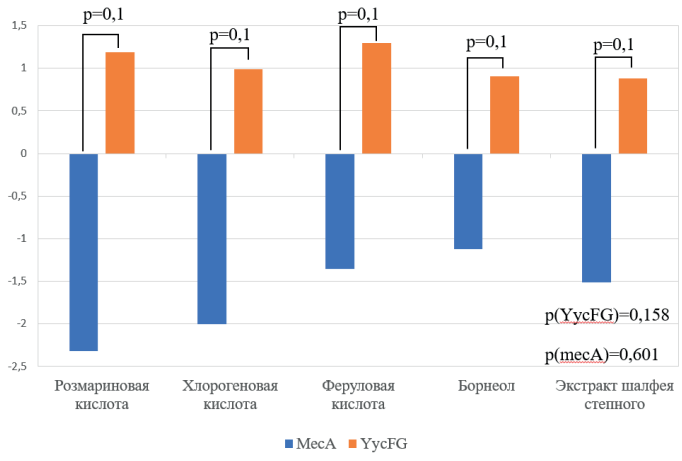

Рисунок 2 – Значения log 2 FC для исследуемых генов

Таблица 1 – Значения log 2 FC для исследуемых генов

Ген	Розмариновая кислота	Хлорогеновая кислота	Феруловая кислота	Борнеол	Экстракт шалфея степного	p
MecA	-2,322	-2	-1,358	-1,12	-1,515	0,601
YycFG	1,19	0,993	1,293	0,91	0,88	0,158

При обратном логарифмировании значении log 2 FC было выявлено, что ген MecA при воздействии розмариновой кислоты в среднем уменьшает экспрессию в 5 раз; при воздействии хлорогеновой кислоты – в среднем уменьшает экспрессию в 4 раза; при воздействии ферулловой кислоты – в среднем уменьшает экспрессию в 2,6 раза; при воздействии борнеола – в среднем уменьшает экспрессию в 2,17 раза; при воздействии экстракта шалфея степного – в среднем уменьшает экспрессию в 2,86 раза (p=0,043). Ген YycFG при воздействии розмариновой кислоты в среднем увеличивает экспрессию в 2,28 раза; при воздействии хлорогеновой кислоты – в среднем увеличивает экспрессию в 1,99 раза; при воздействии ферулловой кислоты – в среднем увеличивает экспрессию в 2,45 раза; при воздействии борнеола – в среднем увеличивает экспрессию в 1,88 раза; при воздействии экстракта шалфея степного – в среднем увеличивает экспрессию в 1,84 раза(p=0,043).

В норме экспрессия MecA у *MRSA* активируется индуцибельно через систему генов MecR1 и MecI. В этой системе ген MecI выступает репрессором, блокируя транскрипцию MecA. Однако при контакте с β-лактамными антибиотиками сенсорный белок MecR1 активируется, связывается с репрессором MecI и снимает его ингибирующее действие, что запускает экспрессию гена MecA и синтез PBP2a, обеспечивающего устойчивость к β-лактамным антибиотикам [5, 20].

Снижение уровня экспрессии гена MecA у большинства штаммов *MRSA* под воздействием розмариновой и хлорогеновой кислот, вероятно, обусловлено подавлением сигнального пути MecR1– MecI, ответственного за контроль синтеза белка PBP2a. Это указывает на потенциал розмариновой и хлорогеновой кислоты в преодолении β-лактамной резистентности.

По данным анализа ΔΔCt у одного штамма была выявлена гиперэкспрессия гена MecA при воздействии всех фенольных соединений и экстракта шалфея степного. Данные выбросы были исключены из дальнейшего статистического анализа. Повышение экспрессии MecA у отдельного штамма может объясняться активацией альтернативных регуляторных систем, например, через SOS-ответ или двухкомпонентную систему vraSR, трансмембранный индуктор MecR1 и вторичных мессенджеров MecR2 стресс-индуцированные сигналы могут подавлять репрессор MecI, блокируя транскрипцию MecA. Наличие мутаций или делеции в MecA или промоторной области pbp4 (ПСБ4) может нарушать нормальную регуляцию оперона mec. Это приводит к гиперэкспрессии пенициллинсвязывающих белков, которая усиливается под действием стрессовых факторов [21, 22, 23].

Различия в регуляции MecA между штаммами обусловлены генетической гетерогенностью *MRSA*, включая полиморфизм в регуляторных областях генов, наличие мобильных генетических элементов (SCCmec) или различия в активности глобальных регуляторов, например, регуляторный локус Agr или регулятор транскрипционных факторов стафилококка A – sarA [5].

Повышение экспрессии двухкомпонентной системы YycFG во всех штаммах под действием розмариновой, хлорогеновой, феруловой кислот, борнеола и большинства штаммов под воздействием экстракта шалфея степного может свидетельствовать об их способности индуцировать стрессовые сигналы, связанные с целостностью клеточной стенки. Система YycFG

активируется при повреждении мембраны, что запускает каскад репарационных процессов и влияет на вирулентность. В целом, увеличение экспрессии системы YycFG у *MRSA* может привести к повышенной устойчивости к внешним стрессовым факторам, антибиотикам и усилению патогенности [6, 7].

Снижение экспрессии системы YycFG у 1 штамма под действием экстракта шалфея может быть связано с подавлением сигнальных путей, ингибированием гистидинкиназной активности Walk или наличием в экстракте дополнительных компонентов, модулирующих транскрипцию [24].

Результаты проведенного исследования демонстрируют, что розмариновая и хлорогеновая кислоты проявляют выраженную способность к подавлению экспрессии гена MecA у *MRSA*. В связи с этим розмариновую и хлорогеновую кислоты целесообразно рассматривать в качестве перспективных агентов для разработки антимикробных препаратов или адъювантов, усиливающих эффективность существующих антибиотиков. В перспективе синергетическое применение розмариновой и хлорогеновой кислоты с β-лактамами может преодолевать устойчивость *MRSA*.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Хлорогеновая и розмариновая кислоты обладают значительным потенциалом для подавления экспрессии гена MecA у *MRSA*. Розмариновая кислота уменьшает экспрессию гена MecA в 5 раз, хлорогеновая кислота уменьшает экспрессию гена MecA в 4 раза. На основе этих данных можно рассматривать данные соединения как многообещающих кандидатов для создания новых антимикробных препаратов или адъювантов, усиливающих действие антибиотиков. В будущем синергетическое сочетание розмариновой и хлорогеновой кислот с β-лактамами может быть эффективным инструментом для преодоления устойчивости MRSA.

ВЫВОДЫ

1. По результатам анализа ΔΔCt было выявлено, что розмариновая кислота и хлорогеновая кислота уменьшили экспрессию гена MecA у 3 штаммов и увеличили экспрессию у 1 штамма, экспрессия гена YycFG во всех 4 штаммах увеличилась. Розмариновая и хлорогеновая кислоты демонстрируют высокий потенциал в подавлении β-лактамной устойчивости у большинства штаммов *MRSA*. Ферулловая кислота, борнеол и экстракт шалфея степного обладают двойственным действием на ген MecA, увеличивая экспрессию у 2 штаммов и уменьшая экспрессию 2 штаммов соответственно. Увеличение экспрессий гена YycFG во всех 4 штаммах при воздействии ферулловой кислотой и борнеолом, а также увеличение большинства штаммов при воздействии экстрактом шалфея степного также вызывают активирование различных путей клеточной адаптации, направленных на сохранение гомеостаза, защиту клеточной мембраны и уменьшение повреждений путем повышения экспрессии двухкомпонентной системы YycFG. Увеличение экспрессии системы YycFG у *MRSA* приводит к усилению патогенности, повышенной устойчивости к антибиотикам и внешним стрессовым факторам.

2. По результатам анализа log 2 Fold Change было выявлено, что ген MecA при воздействии розмариновой кислоты в среднем уменьшает экспрессию в 5 раз; при воздействии хлорогеновой кислоты – в среднем уменьшает экспрессию в 4 раза; при воздействии ферулловой кислоты – в среднем уменьшает экспрессию в 2,6 раза; при воздействии борнеола – в среднем уменьшает экспрессию в 2,17 раза; при воздействии экстракта шалфея степного – в среднем уменьшает экспрессию в 2,86 раза (p=0,043). Ген YycFG при воздействии розмариновой кислоты в среднем увеличивает экспрессию в 2,28 раз; при воздействии хлорогеновой кислоты – в среднем увеличивает экспрессию в 1,99 раза; при воздействии ферулловой кислоты – в среднем увеличивает экспрессию в 2,45 раза; при воздействии борнеола – в среднем увеличивает экспрессию в 1,88 раза; при воздействии экстракта шалфея степного – в среднем увеличивает экспрессию в 1,84 раза (p=0,043).

3. Для определения концентрации воздействия фенольных соединений, борнеола и экстракта шалфея степного были определены минимальные подавляющие концентрации феруловой кислоты (МПК=5,6 мг/мл), борнеола (МПК=8,188 мг/мл), розмариновой кислоты (МПК=12,8 мг/мл), хлорогеновой кислоты (МПК=20,48 мг/мл) и экстракта шалфея степного (МПК=25 мг/мл) в отношений MRSA.

Вклад авторов:

А. Д. Бакенова – сбор и обработка материала, написание текста.

А. Д. Бакенова, И. А. Кадырова – обработка статистических данных и редактирование.

Все авторы принимали участие в разработке концепции и дизайна исследования. Окончательная версия рукописи была одобрена всеми авторами.

Конфликт интересов:

Конфликт интересов не заявлен.

Данный материал ранее не был представлен для публикации в других изданиях и не рассматривается другими издательствами.

ЛИТЕРАТУРА

1. Иванов Ф.В., Гумилевский Б.Ю. Микробиологический мониторинг инфекции, связанной с оказанием медицинской помощи. *Международный научно-исследовательский журнал*. 2023; 12 (138): 1-8.

2. *Centers for Disease Control and Prevention. Methicillin-Resistant Staphylococcus Aureus.* https://www.cdc.gov/antimicrobial-resistance/media/pdfs/MRSA-508.pdf

3. Kaliyeva S.S. Microbial landscape and antibiotic susceptibility dynamics of skin and soft tissue infections in Kazakhstan 2018 – 2020. *Antibiotics*. 2022; 11 (5): 659.

4. Mlynarczyk-Bonikowska B., Kowalewski C., Krolak-Ulinska A., Marusza W. Molecular Mechanisms of Drug

Resistance in Staphylococcus aureus. *International Journal of Molecular Sciences*. 2022; 23 (15): 8088. https://doi.org/10.3390/ijms23158088

5. Алмагамбетов К.Х. Молекулярная биология Staphylococcus aureus. *АМЖ*. 2021 (1). https://cyberleninka.ru/article/n/molekulyarnaya-biologiya-staphylococcus-aureus

6. Wu S., Huang F., Zhang H., Lei L. Staphylococcus aureus biofilm organization modulated by YycFG two-component regulatory pathway. *Journal of Orthopaedic Surgery and Research*. 2019; 14 (1): 10. https://doi.org/10.1186/s13018-018-1055-z

7. Wu S., Zhang J., Peng Q., Liu Y., Lei L., Zhang H. The Role of Staphylococcus aureus YycFG in Gene Regulation, Biofilm Organization and Drug Resistance. *Antibiotics (Basel, Switzerland).* 2021; 10 (12): 1555. https://doi.org/10.3390/antibiotics10121555

8. Dawan J., Ahn J. Bacterial Stress Responses as Potential Targets in Overcoming Antibiotic Resistance. Microorganisms. 2022; 10 (7): 1385. https://doi.org/10.3390/microorganisms10071385.

9. Левая Я.К. *Фармацевтическая разработка готовой лекарственной формы на основе биологически активных веществ шалфея степного*. Караганда: Медицинский университет Караганды; 2023: 153.

10. Бадекова К.Ж., Левая Я.К., Атажанова Г.А., Жолдасбаев М.Е. Биологические свойства розмариновой кислоты. *Фармация Казахстана*. 2020; 7-8: 29-35.

11. Kernou O.-N., Azzouz Z., Madani K., Rijo P. Application of Rosmarinic Acid with Its Derivatives in the Treatment of Microbial Pathogens. *Molecules*. 2023; 28 (10): 4243. https://doi.org/10.3390/molecules28104243

12. Kang J., Liu L., Liu Y., Wang X. Ferulic Acid Inactivates Shigella flexneri through Cell Membrane Destruction, Biofilm Retardation, and Altered Gene Expression. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2020; 68 (27): 7121-7131. https://doi.org/10.1021/acs.jafc.0c01901

13. Li G., Qiao M., Guo Y., Wang X., Xu Y., Xia X. Effect of Subinhibitory Concentrations of Chlorogenic Acid on Reducing the Virulence Factor Production by Staphylococcus aureus. *Foodborne Pathogens and Disease*. 2014; 11 (9): 677-683. https://doi.org/10.1089/fpd.2013.1731

14. Leite-Sampaio N.F., Gondim C.N.F.L., Martins R.A.A., Siyadatpanah A., Norouzi R., Kim B., Sobral-Souza C.E., Gondim G.E.C., Ribeiro-Filho J., Coutinho H.D.M. Potentiation of the Activity of Antibiotics against ATCC and MDR Bacterial Strains with (+)-α-Pinene and (-)-Borneol. *BioMed Research International*. 2022; 2022: 8217380. https://doi.org/10.1155/2022/8217380

15. *ISO 20776-1:2019. Clinical laboratory testing and in vitro diagnostic test systems – Susceptibility testing of infectious agents and evaluation of performance of antimicrobial susceptibility test devices.* Geneva: International Organization for Standardization. 2019: 11.

16. Wang S., Kang O.H., Kwon D.Y. Bisdemethoxycurcumin Reduces Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus Expression of Virulence-Related Exoproteins and Inhibits the Biofilm Formation. *Toxins*. 2021; 13 (11): 804. https://doi.org/10.3390/toxins13110804.

17. Kadyrova I.A., Barkhanskaya V.I. Analysis of the dynamics of gene expression in patients with acute COVID-19 and in recovery period. *Medicine and ecology*. 2024; 2: 48-56. https://doi.org/10.59598/ME-2305-6045-2024-111-2-48-56

18. Sihto H.-M., Tasara T., Stephan R., Johler S. Validation of reference genes for normalization of qPCR mRNA expression levels in Staphylococcus aureus exposed to osmotic and lactic acid stress conditions encountered during food production and preservation. *FEMS Microbiology Letters*. 2014; 356 (1): 134-140. https://doi.org/10.1111/1574-6968.12491

19. *Statisty: Бесплатное онлайн-приложение для статистического анализа данных*. https://statisty.app/

20. Wolska-Gębarzewska M., Międzobrodzki J., Kosecka-Strojek M. Current types of staphylococcal cassette chromosome mec (SCCmec) in clinically relevant coagulase-negative staphylococcal (CoNS) species. *Critical Reviews in Microbiology*. 2024; 50 (6): 1020-1036.

21. Дьячкова В.С., Бажукова Т.А. Механизмы резистентности микроорганизмов к β-лактамным антибиотикам. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2014; 4. https://cyberleninka.ru/article/n/mehanizmy-rezistentnosti-mikroorganizmov-k-laktamnym-antibiotikam

22. Villanueva M., Roch M., Lasa I., Renzoni A., Kelley W. L. The Role of ArlRS and VraSR in Regulating Ceftaroline Hypersusceptibility in Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus. *Antibiotics (Basel, Switzerland).* 2021; 10 (7): 821. https://doi.org/10.3390/antibiotics10070821

23. Гостев В.В., Пунченко О.Е., Сидоренко С.В. Современные представления об устойчивости Staphylococcus aureus к бета-лактамным антибиотикам. *КМАХ*. 2021; 4. https://cyberleninka.ru/article/n/sovremennye-predstavleniya-ob-ustoychivosti-staphylococcus-aureus-k-beta-laktamnym-antibiotikam

24. Абатуров А.Е., Крючко Т.А. Медикаментозное ингибирование активности бактериальных двухкомпонентных систем регуляции. *Здоровье ребенка*. 2018; 13 (3): 326-333.

ТРАНСЛИТЕРАЦИЯ

1. Ivanov F.V., Gumilevskij B.Ju. Mikrobiologicheskij monitoring infekcii, svjazannoj s okazaniem medicinskoj pomoshhi. *Mezhdunarodnyj nauchno-issledovatel'skij zhurnal*. 2023; 12 (138): 1-8.

2. *Centers for Disease Control and Prevention. Methicillin-Resistant Staphylococcus Aureus.* https://www.cdc.gov/antimicrobial-resistance/media/pdfs/MRSA-508.pdf

3. Kaliyeva S.S. Microbial landscape and antibiotic susceptibility dynamics of skin and soft tissue infections in Kazakhstan 2018 – 2020. *Antibiotics*. 2022; 11 (5): 659.

4. Iynarczyk-Bonikowska B., Kowalewski C., Krolak-Ulinska A., Marusza W. Molecular Mechanisms of Drug

Resistance in Staphylococcus aureus. *International Journal of Molecular Sciences*. 2022; 23 (15): 8088. https://doi.org/10.3390/ijms23158088

5. Almagambetov K. H. Molekuljarnaja biologija Staphylococcus aureus. *AMZh*. 2021 (1). https://cyberleninka.ru/article/n/molekulyarnaya-biologiya-staphylococcus-aureus

6. Wu S., Huang F., Zhang H., Lei L. Staphylococcus aureus biofilm organization modulated by YycFG two-component regulatory pathway. *Journal of Orthopaedic Surgery and Research*. 2019; 14 (1): 10. https://doi.org/10.1186/s13018-018-1055-z

7. Wu S., Zhang J., Peng Q., Liu Y., Lei L., Zhang H. The Role of Staphylococcus aureus YycFG in Gene Regulation, Biofilm Organization and Drug Resistance. *Antibiotics (Basel, Switzerland).* 2021; 10 (12): 1555. https://doi.org/10.3390/antibiotics10121555

8. Dawan J., Ahn J. Bacterial Stress Responses as Potential Targets in Overcoming Antibiotic Resistance. Microorganisms. 2022; 10 (7): 1385. https://doi.org/10.3390/microorganisms10071385.

9. Levaja Ja.K. *Farmacevticheskaja razrabotka gotovoj lekarstvennoj formy na osnove biologicheski aktivnyh veshhestv shalfeja stepnogo*. Karaganda: Medicinskij universitet Karagandy; 2023: 153.

10. Badekova K.Zh., Levaja Ja.K., Atazhanova G.A., Zholdasbaev M.E. Biologicheskie svojstva rozmarinovoj kisloty. *Farmacija Kazahstana*. 2020; 7-8: 29-35.

11. Kernou O.-N., Azzouz Z., Madani K., Rijo P. Application of Rosmarinic Acid with Its Derivatives in the Treatment of Microbial Pathogens. *Molecules*. 2023; 28 (10): 4243. https://doi.org/10.3390/molecules28104243

12. Kang J., Liu L., Liu Y., Wang X. Ferulic Acid Inactivates Shigella flexneri through Cell Membrane Destruction, Biofilm Retardation, and Altered Gene Expression. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2020; 68 (27): 7121-7131. https://doi.org/10.1021/acs.jafc.0c01901

13. Li G., Qiao M., Guo Y., Wang X., Xu Y., Xia X. Effect of Subinhibitory Concentrations of Chlorogenic Acid on Reducing the Virulence Factor Production by Staphylococcus aureus. *Foodborne Pathogens and Disease*. 2014; 11 (9): 677-683. https://doi.org/10.1089/fpd.2013.1731

14. Leite-Sampaio N.F., Gondim C.N.F.L., Martins R.A.A., Siyadatpanah A., Norouzi R., Kim B., Sobral-Souza C.E., Gondim G.E.C., Ribeiro-Filho J., Coutinho H.D.M. Potentiation of the Activity of Antibiotics against ATCC and MDR Bacterial Strains with (+)-α-Pinene and (-)-Borneol. *BioMed Research International*. 2022; 2022: 8217380. https://doi.org/10.1155/2022/8217380

15. *ISO 20776-1:2019. Clinical laboratory testing and in vitro diagnostic test systems – Susceptibility testing of infectious agents and evaluation of performance of antimicrobial susceptibility test devices.* Geneva: International Organization for Standardization. 2019: 11.

16. Wang S., Kang O. H., Kwon D. Y. Bisdemethoxycurcumin Reduces Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus Expression of Virulence-Related Exoproteins and Inhibits the Biofilm Formation. *Toxins*. 2021; 13 (11): 804. https://doi.org/10.3390/toxins13110804.

17. Kadyrova I.A., Barkhanskaya V.I. Analysis of the dynamics of gene expression in patients with acute COVID-19 and in recovery period. *Medicine and ecology*. 2024; 2: 48-56. https://doi.org/10.59598/ME-2305-6045-2024-111-2-48-56

18. Sihto H.-M., Tasara T., Stephan R., Johler S. Validation of reference genes for normalization of qPCR mRNA expression levels in Staphylococcus aureus exposed to osmotic and lactic acid stress conditions encountered during food production and preservation. *FEMS Microbiology Letters*. 2014; 356 (1): 134-140. https://doi.org/10.1111/1574-6968.12491

19. *Statisty: Бесплатное онлайн-приложение для статистического анализа данных*. https://statisty.app/

20. Wolska-Gębarzewska M., Międzobrodzki J., Kosecka-Strojek M. Current types of staphylococcal cassette chromosome mec (SCCmec) in clinically relevant coagulase-negative staphylococcal (CoNS) species. *Critical Reviews in Microbiology*. 2024; 50 (6): 1020-1036.

21. D'jachkova V.S., Bazhukova T.A. Mehanizmy rezistentnosti mikroorganizmov k β-laktamnym antibiotikam. *Zhurnal mikrobiologii, jepidemiologii i immunobiologii.* 2014; 4. https://cyberleninka.ru/article/n/mehanizmy-rezistentnosti-mikroorganizmov-k-laktamnym-antibiotikam

22. Villanueva M., Roch M., Lasa I., Renzoni A., Kelley W. L. The Role of ArlRS and VraSR in Regulating Ceftaroline Hypersusceptibility in Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus. *Antibiotics (Basel, Switzerland).* 2021; 10 (7): 821. https://doi.org/10.3390/antibiotics10070821

23. Gostev V.V., Punchenko O.E., Sidorenko S.V. Sovremennye predstavlenija ob ustojchivosti Staphylococcus aureus k beta-laktamnym antibiotikam. *KMAH*. 2021; 4. https://cyberleninka.ru/article/n/sovremennye-predstavleniya-ob-ustoychivosti-staphylococcus-aureus-k-beta-laktamnym-antibiotikam

24. Abaturov A.E., Krjuchko T.A. Medikamentoznoe ingibirovanie aktivnosti bakterial'nyh dvuhkomponentnyh sistem reguljacii. *Zdorov'e rebenka*. 2018; 13 (3): 326-333.

Поступила 25.06.2024
Направлена на доработку 21.07.2024
Принята 18.03.2025
Опубликована online 30.06.2025

I. A. Kadyrova[1], A. D. Bakenova[1], A. V. Lavrinenko[1], I. A. Belyaev[1], G. A. Atazhanova[2], Y. K. Levaya[2]*

EVALUATION OF MECA AND YYCFG GENE EXPRESSION DYNAMICS IN METHICILLIN-RESISTANT STAPHYLOCOCCUS AUREUS (MRSA) UNDER THE INFLUENCE OF PHENOLIC COMPOUNDS, BORNEOL AND EXTRACT OF SALVIA STEPPE (SALVIA STEPPOSA DES. -SHOST)

[1]Scientific Research Laboratory, Karaganda medical university NC JSC (100008, Republic of Kazakhstan, Karaganda city, Gogolya str., 40; e-mail: info@qmu.kz)
[2]School of Pharmacy, Karaganda medical university NC JSC (100008, Republic of Kazakhstan, Karaganda city, Gogolya str., 40; e-mail: info@qmu.kz)

[*]**Altyn Duisenkyzy Bakenova** – Scientific Research Laboratory, Karaganda medical university NC JSC; 100008, Republic of Kazakhstan, Karaganda city, Gogolya str., 40; e-mail: bakenovaa02@gmail.com

Introduction. Staphylococcus aureus demonstrates sufficient adaptive potential under external stress conditions, which may determine its key role in the etiology of hospital-acquired infections. The observed exponential growth of strains with multiple antibiotic resistance over the past decades indicates that adaptation mechanisms contribute to the survival and spread of S. aureus under conditions of intensive hospital exposure to antimicrobial agents. This phenomenon significantly complicates the clinical treatment of infections and poses a serious threat to the healthcare system. Despite the active study of changes in the activity of genes associated with antibiotic resistance under various stress conditions, the role of phenolic compounds in the regulation of gene expression in MRSA has been insufficiently studied. In particular, there are practically no data on the effect of phenolic compounds and borneol on the expression of the MecA and YycFG genes, which determines the relevance of this work.

Aim. To evaluate the dynamics of MecA and YycFG gene expression in methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) under the influence of phenolic compounds (rosmarinic, chlorogenic and ferulic acids), borneol and Salvia Stepposa Des. -Shost leaf extract.

Materials and methods. The MICs of the studied compounds were determined using the serial dilution micromethod. To evaluate the effect of the studied compounds, daily MRSA cultures were additionally incubated with the studied compounds at subinhibitory concentrations (1/2 MIC) for 4 hours. Changes in MecA and YycFG expression were analyzed by quantitative PCR (ΔΔCt, log2 Fold Change). GyrB expression was assessed as an endogenous control. Statistical processing included the Kruskal-Wallis, Wilcoxon and Mann-Whitney tests (p=0.05).

Results and discussion. The results showed that phenolic compounds, borneol and Salvia stepposa leaf extract reduced MecA expression by 2.17-5 times (p=0.043) and increased YycFG by 1.84-2.45 times (p=0.043). Rosmarinic and chlorogenic acids showed the greatest activity towards MecA.

Conclusion. Chlorogenic and rosmarinic acids have significant potential to suppress MecA expression in MRSA. Rosmarinic acid reduces MecA expression by 5 times, chlorogenic acid by 4 times. These results allow us to consider the studied compounds as promising candidates for the development of new antimicrobial drugs or adjuvants that enhance the effect of antibiotics. In the future, the synergistic combination of rosmarinic and chlorogenic acids with β-lactams may become an effective tool for overcoming MRSA resistance.

Key words: MRSA; gene expression; qPCR; MecA gene; YycFG gene; phenolic compounds; borneol; Salvia Stepposa extract

И. А. Кадырова[1], А. Д. Бакенова[1], А. В. Лавриненко[1], И. А. Беляев[1], Г. А. Атажанова[2], Я. К. Левая[2]*

СӘЛБЕН ШАЛФЕЙІНЕН БӨЛІНГЕН СЫҒЫНДЫНЫҢ, ФЕНОЛДЫҚ ҚОСЫЛЫСТАР МЕН БОРНЕОЛДЫҢ ЭСЕРІ АСТЫНДА МЕТИЦИЛЛИНГЕ ТӨЗІМДІ STAPHYLOCOCCUS AURUS (MRSA) MECA ЖӘНЕ YYCFG ГЕНІНІҢ ЭКСПРЕССИЯСЫНЫҢ ДИНАМИКАСЫН БАҒАЛАУ

[1]Ғылыми-зерттеу зертханасы «Қарағанды медицина университеті» КЕАҚ (100008, Қазақстан Республикасы, Қарағанды қ., Гоголь к-сі, 40; e-mail: info@qmu.kz)
[2]Фармация мектебі «Қарағанды Медицина Университеті» КЕАҚ (100008, Қазақстан Республикасы, Қарағанды қ., Гоголь к-сі, 40; e-mail: info@qmu.kz)

[*]**Алтын Дуйсенкызы Бакенова** – Ғылыми-зерттеу зертханасы «Қарағанды медицина университеті» КЕАҚ; 100008, Қазақстан Республикасы, Қарағанды қ., Гоголь к-сі, 40; e-mail: bakenovaa02@gmail.com

Кіріспе. *Staphylococcus aureus* сыртқы стресс жағдайында жеткілікті бейімделу потенциалын көрсетуіне байланысты оның ауруханаішілік инфекциялардың этиологиясындағы негізгі рөлін анықтауы мүмкін. Соңғы онжылдықтарда көп антибиотиктерге төзімді штаммдардың байқалған экспоненциалды өсуі бейімделу

механизмдері микробқа қарсы агенттердің қарқынды стационарлық әсер ету жағдайында *S. aureus* өмір сүруіне және таралуына ықпал ететінін көрсетеді. Бұл құбылыс инфекциялардың клиникалық емделуін айтарлықтай қиындатады және денсаулық сақтау жүйесіне үлкен қауіп төндіреді. Әртүрлі стресс жағдайында антибиотиктерге төзімділікпен байланысты гендердің белсенділігінің өзгеруін белсенді зерттеуге қарамастан, *MRSA* штамдардың гендердің белсенділігін реттеудегі фенолдық қосылыстардың рөлі жеткіліксіз зерттелген. Атап айтқанда, фенолды қосылыстар мен борнеолдың MecA және YycFG гендерінің экспрессиясына әсері туралы деректер іс жүзінде жоқ, бұл осы жұмыстың өзектілігін анықтайды.

Зерттеудің мақсаты. Жұмыстың мақсаты фенолды қосылыстардың (розмарин, хлороген және ферул қышқылдары), борнеол және сәлбен шалфейінің (*Salvia stepposa Des.-Shost*) жапырақтарынан бөлінген сығындының әсерінен метициллинге төзімді алтын түсті стафилококктың (*MRSA*) құрамында MecA және YycFG генінің экспрессиясының динамикасын бағалау.

Материалдар және әдістер. Сериялық сұйылтудың микроәдісімен зерттелетін қосылыстардың MIC минималды ингибиторлық концентрациясы анықталды. Зерттелетін қосылыстардың әсерін бағалау үшін MR*S*A тәулік дақылдары 4 сағат бойы субингибиторлық концентрацияларда (1/2 MIC) зерттелетін қосылыстармен қосымша инкубацияланды. MecA және YycFG гендерінің өзгерістері сандық ПТР (ΔΔCt, log2 Fold Change) арқылы анықталды. GyrB экспрессиясы эндогендік бақылау ретінде бағаланды. Статистикалық өңдеуге Крускал – Уоллис, Вилкоксон және Манн – Уитни сынақтары кірді (p=0,05).

Нәтижелер және талқылау. Фенолды қосылыстар, борнеол және сәлбен шалфейінің жапырақ сығындысы MecA экспрессиясын 2,17-5 есе төмендететінін (p=0,043) және YycFG экспрессиясын 1,84-2,45 есеге артатынын (p=0,043) көрсетті. Розмарин және хлороген қышқылдары MecA геніне қарсы ең жоғары белсенділікті көрсетті.

Қорытынды. Хлороген және розмарин қышқылдары MRSA-тың MecA экспрессиясын басу үшін маңызды әлеуеті бар екені анықтады. Розмарин қышқылы MecA экспрессиясын 5 есе, хлороген қышқылы 4 есе төмендетеді. Бұл нәтижелер зерттелетін қосылыстарды жаңа микробқа қарсы препараттарды немесе антибиотиктердің әсерін күшейтетін адъюванттарды жасау үшін перспективалы үміткерлер ретінде қарастыруға мүмкіндік береді. Болашақта розмарин және хлороген қышқылдарының β-лактамдармен синергетикалық әсерімен MRSA төзімділігін жеңудің тиімді құралы болуы мүмкін.

Кілт сөздер: MRSA; ген экспрессиясы; qPCR; MecA гені; YycFG гені; фенолды қосылыстар; борнеол; сәлбен шалфей сығындысы