

Журлов О.С., Гриценко В.А., Черников Д.А., Гриценко Я.В.
НИИ клеточного и внутриклеточного симбиоза УрО РАН, Оренбург
Оренбургская государственная медицинская академия Росздрава

МОРФО-ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ И ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ ПРОЯВЛЕНИЯ АДАПТАЦИИ ЭШЕРИХИЙ К ЖЕЛЧИ И КАТИОННЫМ АНТИМИКРОБНЫМ БЕЛКАМ

В работе представлены экспериментальные данные, отражающие особенности изменения морфо-физиологических и физико-химических характеристик эшерихий при их адаптации к желчи и катионным антимикробным белкам лейкоцитов и тромбоцитов человека.

Ключевые слова: *Escherichia coli*, желчь, катионные антимикробные белки, лейкодефенсины, тромбодифенсины, адаптация, электрокинетический потенциал, гидрофобность.

Введение

Инфекционно-воспалительные заболевания гепатобилиарной системы остаются актуальной проблемой современной хирургии. В развитии воспалительного процесса как в желчном пузыре (холецистит), так и желчевыводящих путях (холангит) важную роль играют микроорганизмы – прежде всего эшерихии [3]. Очевидно, способность возбудителей паразитировать в этих биотопах человека напрямую связана с возможностью бактерий противостоять губительному действию эффекторов неспецифической резистентности макроорганизма, к которым, в частности, относятся желчь и катионные антимикробные белки лейкоцитов и тромбоцитов, или адаптироваться к ним [2, 5]. Вместе с тем мы пока располагаем фрагментарными данными об особенностях адаптации эшерихий к указанным защитным факторам.

В этой связи целью настоящего исследования явился анализ морфо-физиологических и физико-химических проявлений адаптации энтеробактерий к желчи и катионным антимикробным белкам.

Материалы и методы

Материалом служили 42 культуры эшерихий, изолированные из желчи от больных с холециститом и холангитом, а также музейный штамм *Escherichia coli* K12. Идентификацию выделенных бактерий осуществляли с использованием официальных наборов «Enterо-Test I-II» («Lachema», Чехия). В работе использовали сухую желчь КРС (г. Оболенск, Московская обл.), опытный образец (серия С2) катионного белка «интерцида», полученного из активированных лейкоцитов человека в Уфимском НИИВС им. И.И. Меч-

никова [2], и экспериментальный образец тромбодифенсинов (ТД), выделенных из тромбоцитов человека с помощью кислотной экстракции [11]. Их добавляли в мясопептонный бульон (МПБ), добываясь предварительно подобранных концентраций.

О развитии эшерихий при 37°C в МПБ (без и в присутствии желчи или катионных антимикробных белков) судили по следующим характеристикам: динамике бактериальной биомассы, для чего ежедневно регистрировали оптическую плотность (ОД) культур на фотоэлектроколориметре (КФК-2, $\lambda=440$ и 540 нм, ширина кюветы 0,5 см); удельной скорости роста (μ , ч⁻¹) [8]; среднему размеру клеток в популяции *E. coli*, оцениваемому по интегральному параметру R (усл.ед.), который находили по формуле $R=5/y$, где y – волновая экспонента, рассчитанная по формуле $y=LN(OD_{440}/OD_{540})/LN(540/440)$ [4].

Электрокинетический заряд (дзета-потенциал) бактерий определяли амплитудно-частотным методом, измеряя их подвижность в микроэлектрофоретической камере Дзетометра-1М (г. Иваново) при режиме: амплитуда – 10 В, частота – 0,2 Гц [9]. Степень гидрофобности поверхности бактерий определяли методом разделения клеток в двухфазной системе «жидкость-жидкость» с несмешивающимися водными фазами, обогащенными полиэтиленгликолем (PEG 6000; 4,5%) и декстраном (Т 500; 6,2%) [6], и оценивали по величине гидрофильно-липофильного баланса (ГЛБ), рассчитанной по формуле: $ГЛБ=Lg(OD_{PEG}/OD_{Dextran})$, где OD_{PEG} и $OD_{Dextran}$ – оптические плотности бактериальных суспензий соответственно в верхней и нижней фазах системы после расслоения [1].

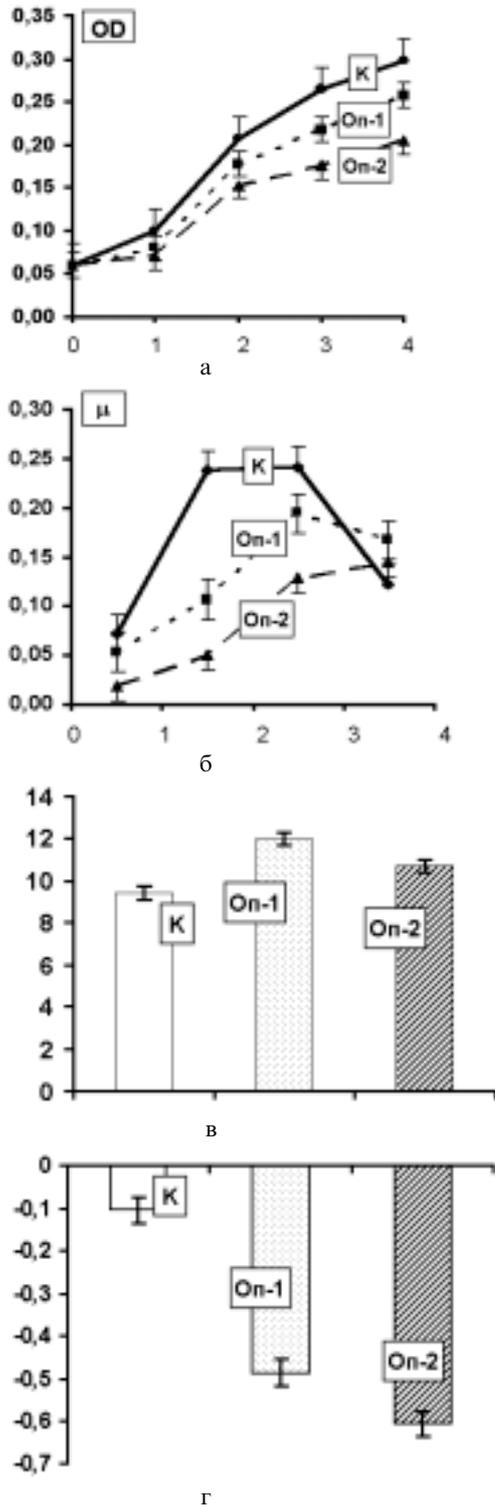


Рисунок 1. Накопление биомассы (А), удельная скорость роста (Б), дзета-потенциал (В) и ГЛБ (Г) *E. coli* при росте в МПБ с желчью. По оси абсцисс: для А и Б – время культивирования (час); по оси ординат: для А – накопление биомассы (OD, усл.ед), для Б – удельная скорость роста (μ , ч⁻¹), для В – дзета потенциал (mV), для Г – гидрофобность (ГЛБ, усл.ед.). Для линий и столбиков: К – МПБ без желчи (контроль); Оп-1 – МПБ+желчь (40 мг/мл); Оп-2 – МПБ+желчь (80 мг/мл).

Статистическую обработку данных осуществляли с помощью методов вариационной статистики [7].

Результаты и их обсуждение

Анализ динамики накопления биомассы эшерихий в МПБ с добавлением желчи показал, что желчь оказывает на развитие *E. coli* в бульонной культуре угнетающее действие, степень которого зависела от использованных в опытах концентраций – 40 и 80 мг желчи/мл (рис. 1А). В то же время наблюдалась относительно быстрая адаптация эшерихий к данному бактерицидному агенту, о чем свидетельствовало частичное восстановление спустя 2-3 часа от начала культивирования такого физиологического параметра, как удельная скорость роста эшерихий (рис. 1Б). Морфометрическим проявлением приспособления *E. coli* к желчи явилось уменьшение среднего размера бактерий (R) в опытных культурах на 4 ч инкубации в сравнении с контролем ($1,4 \pm 0,2$ и $1,2 \pm 0,2$ усл.ед. против $2,3 \pm 0,3$ усл.ед.). Кроме того, адаптация эшерихий к желчи сопровождалась изменением физико-химических свойств поверхности бактериальных клеток, что выразилось в увеличении электрокинетического заряда и снижении степени гидрофобности бактерий при их культивировании 4 ч в МПБ с концентрацией желчи 40 и 80 мг/мл. Так, дзета-потенциал эшерихий в опытных культурах соответственно повысился до $12,0 \pm 0,5$ и $10,7 \pm 0,3$ mV (против $9,4 \pm 0,1$ mV в контроле, $p < 0,05$) (рис. 1В), а величина ГЛБ *E. coli* уменьшилась до $-0,49 \pm 0,02$ и $-0,61 \pm 0,02$ усл.ед. (против $-0,11 \pm 0,06$ усл.ед. в контроле, $p < 0,05$) (рис. 1Г).

В экспериментах на музейном штамме *E. coli* K12 определен комплекс морфо-физиологических параметров (накопление биомассы, удельная скорость роста, размер клеток) и физико-химических характеристик (дзета-потенциал, ГЛБ) эшерихий при их культивировании в МПБ с добавлением катионных антимикробных белков лейкоцитов и тромбоцитов («интерцид» и ТД) до конечных концентраций 2,0 и 0,07 мг белка/мл соответственно. Как и в опытах с желчью, присутствие в среде бактерицидных агентов в указанных концентрациях не носило катастрофический характер, а лишь замедляло про-

цесс накопления бактериальной биомассы в культуре (рис. 2А).

На адаптацию эшерихий к «интерциду» и ТД указывало практически полное восстановление удельной скорости роста бактерий в опытных культурах через 2-4 ч инкубации (рис. 2Б). Вместе с тем, отмечено, что изменение морфометрических параметров (R) эшерихий, адаптированных к «интерциду» и тромбодифенсинам, носило разнонаправленный характер. Так, через 4 ч культивирования в МПБ с «интерцидом» средние размеры клеток *E. coli* были на 16,7% меньше, чем в контроле ($3,5 \pm 0,1$ против $4,2 \pm 0,2$ усл.ед.; $p < 0,05$), в то время как при адаптации эшерихий к ТД отмечалась обратная тенденция – в сравнении с контролем бактерии из опытных культур имели увеличенный на 13,2% средний размер клеток ($4,3 \pm 0,3$ против $3,8 \pm 0,2$ усл.ед.; $p > 0,05$). В то же время при адаптации *E. coli* K12 к «интерциду» и ТД у бактерий из опытных культур через 4 ч инкубации регистрировалось незначительное снижение дзета-потенциала ($26,2 \pm 0,2$ и $24,3 \pm 0,8$ mV соответственно) в сравнении с контролем ($27,4 \pm 0,4$ mV, $p > 0,05$) (рис. 2В), а также повышение степени гидрофобности относительно контроля ($-0,55 \pm 0,03$ и $-0,84 \pm 0,06$ усл.ед. против $-0,88 \pm 0,02$ усл.ед.), достоверно более выраженное в опыте с «интерцидом» ($p < 0,05$).

Анализируя полученный материал в целом, следует отметить, что адаптация эшерихий к желчи и катионным антимикробным белкам («интерцид», тромбодифенсины), которые можно рассматривать в качестве стресс-факторов для бактерий, сопровождалась модификацией морфо-физиологических и физико-химических характеристик микроорганизмов. Однако проявления адаптации *E. coli* к указанным стрессовым факторам имели как общие, так и специфические закономерности (табл.).

Наличие последних, очевидно, связано не только с разным характером использованных в работе стрессовых воздействий, но и с особенностями ответных реакций бактерий, позволяющих им в конечном итоге приспосабливаться к конкретным стресс-факторам. Вероятно, при адаптации бактерий к тому или иному агенту экспрессируются различные группы генов, кодирующие синтез «специфических» белков, что может отразиться

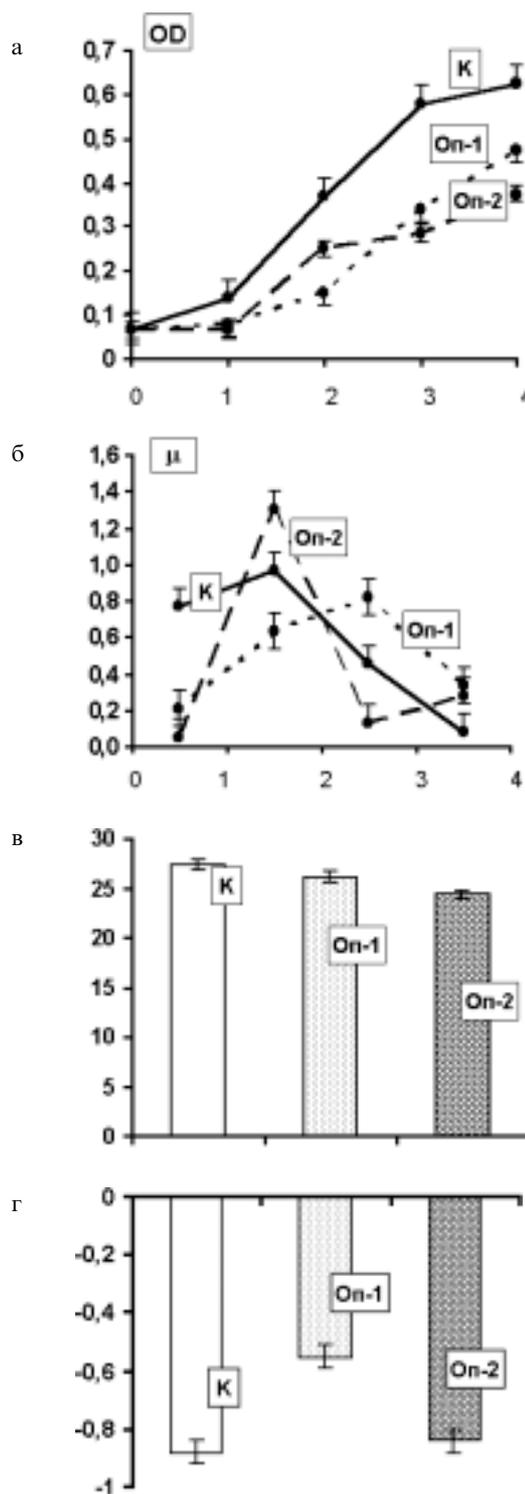


Рисунок 2. Накопление биомассы (А), удельная скорость роста (Б), дзета-потенциал (В) и ГЛБ (Г) *E. coli* K12 при росте в МПБ с катионными белками. По оси абсцисс: для А и Б – время культивирования (час); по оси ординат: для А – накопление биомассы (OD, усл.ед), для Б – удельная скорость роста (μ , $ч^{-1}$), для В – дзета-потенциал (mV), для Г – гидрофобность (ГЛБ, усл.ед.). Для линий и столбиков: К – МПБ(контроль); Оп-1 – МПБ+интерцид (2мг/мл); Оп-2 – МПБ+ТД (0,07 мг белка на мл)

Таблица 1. Общие и специфические закономерности изменения морфо-физиологических и физико-химических свойств эшерихий при адаптации к желчи и катионным антимикробным белкам

Параметры бактерий	Желчь	Катионные антимикробные белки	
		«Интерцид»	ТД
Удельная скорость роста (μ)	частичное восстановление	частичное восстановление	частичное восстановление
Размер клеток (R, усл.ед.)	↓	↓	↑
Дзета-потенциал (mV)	↑	↓	↓
ГЛБ (усл.ед.)	↓	↑	↑

Примечание: ТД – тромбодифензины; стрелка указывает вектор изменения параметра бактерий

как на морфометрических параметрах, так и на физико-химических свойствах микроорганизмов [10, 12]. Подтверждением этой позиции служат приведенные в работе данные о разнонаправленном изменении размера, дзета-потенциала и степени гидрофобности клеток эшерихий, адаптированных к желчи и катионным антимикробным белкам лейкоцитов и тромбоцитов человека.

Безусловно, полученные в экспериментах *in vitro* данные не могут быть прямо экстраполированы на ситуацию *in vivo*, где указанные бактерицидные агенты, действуя на микроорганизмы в ряде случаев сочетано или в присутствии иных эффекторов иммунитета (лизоцим, активные формы кислорода, иммуноглобулины и др.), способны по-

тенцировать (или «отменять») выявленные эффекты. Однако они представляют интерес как иллюстрация возможных векторов модификации морфо-физиологических и физико-химических характеристик эшерихий в процессе их адаптации к условиям паразитирования в макроорганизме, в том числе при развитии инфекционно-воспалительных заболеваний гепатобилиарной системы. Кроме того, знания об особенностях биофильей бактерий, адаптированных к комплексу факторов определенных биотопов макроорганизма, важны в прикладном аспекте, поскольку могут быть использованы для разработки способов идентификации возбудителей и дифференциации их от транзитной микрофлоры.

Список использованной литературы:

1. Брудастов Ю.А., Гриценко В.А., Журлов О.С., Чертков К.Л. Характеристика гидрофобных свойств бактерий при их взаимодействии с сывороткой крови. Журн. микробиол., 1997, 4: 73-77.
2. Бухарин О.В., Гриценко В.А. Влияние *in vitro* препарата лейкоцитарного катионного белка «Интерцид» на *Escherichia coli*. Антибиот. и химиотер., 2000, 45 (1): 16-20.
3. Бухарин О.В., Гриценко В.А., Третьяков А.А., Черников Д.А. Видовой спектр и антибиотикорезистентность энтеробактерий, выделенных из желчи больных холангитом. Антибиот. и химиотер., 2006, 51 (3/4): 7-12.
4. Гриценко В.А. Анализ взаимосвязи между размером клеток и уровнем антилизоцимной активности у *Escherichia coli* в периодических культурах. Микробиология, 2001, 70 (3): 421-423.
5. Гриценко В.А., Брудастов Ю.А., Кудря Е.В., Васильева Л.И. Сравнительный анализ чувствительности к желчи энтеробактерий. Журн. микробиол., 2002, 3: 65-67.
6. Джерсон Д. Применение методов физики поверхностей в иммунологии/Иммунология. Методы исследований. Под ред. Лефковитс И., Пернис Б., М.: Мир, 1983: 122-158.
7. Лакин Г.Ф. Биометрия, М.: Высш. шк., 1990. – 352 с.
8. Перт С. Дж. Основы культивирования микроорганизмов и клеток. – М., 1978.
9. Смирнов К.К. Исследования поверхностной гетерогенности популяции энтеробактерий. Дисс. ... канд. мед. наук. – Иваново, 1984. – 232 с.
10. Gomez-Zavaglia, A., Kociubinski, G., Perez, P., Disalvo, E., De Antonio, G. Effect of bile on the lipid composition and surface properties of bifidobacteria. J. Appl. Microbiol., 2002, 93: 794-799.
11. Ivanov I.B. *In vitro* resistance to human platelet microbicidal protein among urethral staphylococcal and enterococcal isolates with its correlation with prostatitis. Ind. J. Med. Microbiol. 2005. 23 (4): 274-276.
12. McLaughlin S. Electrostatic Potentials at Membrane-Solution Interfaces, Current Topics in Membranes and Transport, 1977, 9: 71-44.