

МОДЕЛЬ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ *Acanthamoeba castellanii* С БАКТЕРИЯМИ *Salmonella enterica* serovar Typhimurium 14028S

Способность сальмонелл выживать и размножаться внутри клеток свободноживущих амёб обеспечивает бактериям возможность переживать неблагоприятные условия окружающей среды. Однако, многие аспекты, связанные с выживанием сальмонелл в окружающей среде и взаимодействием с эукариотами остаются малоизученными.

Изучено взаимодействие *Salmonella enterica* serovar Typhimurium 14028S с клетками свободноживущих амёб *Acanthamoeba castellanii*. Установлено, что бактерии данного штамма способны проникать и выживать внутри фагосом *A. castellanii*. Большая часть сальмонелл поглощается клетками амёб в течение первого часа сокультивирования. Цитотоксический эффект сальмонелл наблюдается в отношении акантамеб после 8 часов сокультивирования и достигает максимума через 16 часов.

Разработанная модель взаимодействия сальмонелл и акантамеб перспективна для изучения стратегии выживания патогенных микроорганизмов в условиях внешней среды. Данная модель может быть использована для оценки экспрессии генов сальмонелл при фагоцитозе простейшими.

Ключевые слова: *Salmonella*, *Acanthamoeba*, вирулентность, фагоцитоз.

Фагоцитоз у свободноживущих протистов представляет собой базовый механизм, как и у фагоцитирующих клеток человека, а условия внутри пищеварительной вакуоли простейших подобны условиям внутри фагосомы макрофагов [1]–[3]. Устойчивость внутриклеточных патогенов к перевариванию со стороны гетеротрофных протистов может способствовать их сохранению в природных очагах инфекции [4]. Доказано, что взаимодействия между патогенами и амёбами участвуют в поддержании вирулентности бактерий [5], [6]. Изучение взаимодействия свободноживущих амёб и патогенов человека важно для раскрытия механизмов проникновения бактерий в человеческий организм и преодоления эффекта киллинга со стороны фагоцитов.

Целью наших исследований стало изучение взаимодействия свободноживущих амёб *A. castellanii* и патогенных бактерий *S. enterica* serovar Typhimurium, разработка оптимальной модели взаимодействия *Salmonella-Acanthamoeba*.

Материалы и методы

Штамм *S. enterica* serovar Typhimurium 14028S, любезно предоставленный к.б.н. Н. Е. Гоголевой (Казанский институт биохимии и биофизики КазНИЦ РАН), – факультативный внутриклеточный патоген, вызывающий гастроэнтериты у людей и домашних животных. Геном данного штамма полностью секвенирован [7].

Культура гетеротрофных простейших *A. castellanii* Neff (ATCC® 30010™) – представитель свободноживущих амёб, обитающих в почвах, водоемах, а также морских экосистемах, где они являются консументами бактерий [8]. Данный штамм является аксенической культурой.

Для культивирования амёб использовали среду PYG (20 г/л пептона, 1 г/л дрожжевого экстракта, 18 г/л глюкозы, 1 г/л цитрат натрия, 0.4 мМ CaCl₂, 4 мМ MgSO₄, 2.5 мМ Na₂HPO₄, 2.5 мМ KH₂PO₄, 50 нМ Fe(NH₄)₂(SO₄)₂).

Для удаления внеклеточных сальмонелл, а также остатков среды, использовали центрифугирование при 900 об/мин с буферным раствором PAS (0.4 мМ CaCl₂, 4 мМ MgSO₄, 2.5 мМ Na₂HPO₄, 2.5 мМ KH₂PO₄, 50 нМ Fe(NH₄)₂(SO₄)₂).

Инфицирование амёб проводилось по методике Douesnard-Malo [9] с модификациями. Десятичасовая культура *S. enterica* serovar Typhimurium 14028S выращена на среде LB. Отмытые клетки бактерий помещали в суспензию амёб, сокультивировали в течение 1 часа, внеклеточные бактерии удаляли трехкратным центрифугированием с буфером PAS. В процессе фагоцитоза контролировалась численность жизнеспособных бактерий путем высева на плотную среду. Жизнеспособность амёб оценивали с использованием автоматического счетчика клеток NucleoCounter NC-200 (Chemometec), а также с помощью световой микроскопии. Про-

цесс фагоцитоза и количество поглощенных клеток оценивали флуоресцентной микроскопией с использованием витальных красителей LiveDead (Thermo Fisher). Статистическая значимость определялась с использованием непараметрического критерия Манна-Уитни [10].

Исследования проведены на базе Центра коллективного пользования научным оборудованием «Персистенция микроорганизмов».

Результаты исследований

В исследованиях была оценена динамика численности сальмонелл (рис. 1) и амёб, растущих при различной концентрации питательных веществ в среде. В результате было выявлено, что при инокуляции сальмонелл в среды 1/10 PYG (PYG:PAS = 1:10) и 1/5 PYG (PYG:PAS = 1:5) в первые 2 часа происходит адаптация клеток к новой среде, после чего наблюдается резкое возрастание численности сальмонелл. В свою очередь, при инкубировании на

фосфатно-солевом буфере (PAS) КОЕ сальмонелл в течение первых суток значительно не увеличивается.

Для амёб наблюдается схожая картина динамики численности жизнеспособных клеток. В первые часы эксперимента клетки амёб, помещенные в среду PAS, сохраняют свою жизнеспособность и численность, морфология клеток не претерпевает изменений. Инцистирование происходит только на 3-5 сутки.

Большая часть сальмонелл поглощается клетками амёб в первые минуты сокультивирования, после чего количество поглощенных клеток медленно растет. После 1 часа сокультивирования наблюдается максимум поглощенных клеток. В дальнейшем, через 2 часа наблюдается рост популяции внеклеточно локализованных сальмонелл в среде, содержащей PYG. В среде PAS плотность популяции сальмонелл остается на уровне, зафиксированном на старте эксперимента. Установлено,

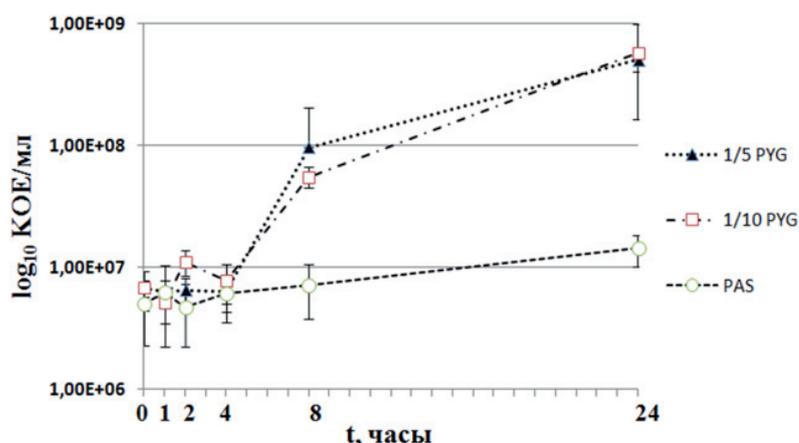


Рисунок 1 – Динамика численности сальмонелл при росте на питательных средах с различным содержанием органического углерода при 25°С. Ось абсцисс – количество сальмонелл, ось ординат – время инкубации

Таблица 1 – Определение жизнеспособности амёб после 2 часов совместного культивирования клетками сальмонелл при различной исходной плотности сальмонелл. Жизнеспособность амёб определяли с помощью автоматического счетчика клеток NucleoCounter NC-200 (Chemometec)

Соотношение клеток амёб:сальмонелл	Количество жизнеспособных амёб, в %	log ₁₀ КОЕ/мл внутриклеточно локализованных сальмонелл	log ₁₀ КОЕ/мл сальмонелл в супернатанте
1:0 (Контроль)	87,43±3,68	-	-
1:10	82,27±1,78	3,36	-
1:100	81,9±5,45	4,56	-
1:1000	88,57±4,36	5,72	4,66
1:10000	86,3±1,89	6,75	5,66

что в первые часы сокультивирования гибель амёб под воздействием сальмонелл не наблюдается. Цитотоксическое действие сальмонелл на амёбы начиналось приблизительно с 8 часа сокультивирования и через 16 часов достигало максимума, в среде культивирования наблюдалось множество амёбных цист.

Для определения исходного оптимального соотношения клеток амёб и сальмонелл в среде была оценена жизнеспособность амёб после 2 часов сокультивирования с различным исходным титром сальмонелл при заражении (таблица 1).

Жизнеспособность амёб оценивали с помощью автоматического счетчика NucleoCounter NC-200, а также микроскопически с использованием витальных красителей. Концентрацию внутриклеточно локализованных сальмонелл определяли после трехкратного центрифугирования, с последующим лизисом амёб с помощью 1% раствора додецилсульфата натрия, и высевом серийных разведений на МПА. Также высевали супернатант после третьего центрифугирования для определения остаточного количества сальмонелл, находящихся в среде. В результате было выявлено, что при определенном соотношении клеток амёб и сальмонелл, превышающем 1 к 100, невозможно полностью избавиться от сальмонелл, находящихся в среде даже после 4 и 5 центрифугирования. По-видимому, данный эффект связан с тем, что при многократных центрифугированиях часть амёб лизируется, и сальмонеллы выходят в среду.

Заключение

Для изучения взаимодействия патогенных сальмонелл и свободноживущих амёб мы использовали среду, лишенную источников углерода. В результате бактерии в данной среде активно не размножались, и можно было оценить влияние внутриклеточно локализованных сальмонелл на жизнеспособность амёб. Установле-

но, что в первые часы сокультивирования более 85% амёб сохраняют свою жизнеспособность. Отсроченный цитотоксический эффект [11], по-видимому связан с адаптацией сальмонелл к изменившимся условиям окружающей среды, и последующей репликацией устойчивых к фагоцитозу клеток сальмонелл внутри амёб [12], [13].

Результатом проведенных нами исследований стала разработка оптимальной модели сокультивирования аксеничной культуры амёб *A. castellanii* Neff с вирулентным штаммом сальмонеллы *S. enterica* serovar Typhimurium 14028s, характеризующейся следующими показателями:

- 1) наблюдается стабильная численность сальмонелл и амёб в течение эксперимента;
- 2) сохраняется численность жизнеспособных амёб, а также способность амёб к фагоцитозу;
- 3) достигается достаточное количество внутриклеточно локализованных для проведения транскриптомного анализа сальмонелл, при этом количество внеклеточных бактерий не вносит значительной погрешности.

Таким образом, мы рекомендуем следующие параметры сокультивирования *S. enterica* serovar Typhimurium 14028s с культурой амёб *A. castellanii* Neff:

- 1) Среда для культивирования должна содержать минимум органического углерода, что позволяет лимитировать количество внеклеточных бактерий [14];
- 2) Удаление внеклеточно локализованных сальмонелл следует проводить после 1 часа сокультивирования, так как за это время происходит максимальное количество поглощенных клеток сальмонелл;
- 3) Соотношение амёб к сальмонеллам не должно превышать 1 к 100, в таком случае наблюдается максимальное количество внутриклеточно локализованных сальмонелл.

4.07.2017

Авторы выражают благодарность к.м.н. Плотникову А. О. за неоценимую помощь, оказанную в процессе выполнении работы.

Список литературы:

1. Lock R. Phagocytic recognition mechanisms in human granulocytes and *Acanthamoeba castellanii* using type 1 fimbriated *Escherichia coli* as phagocytic prey / R. Lock, L. Ohman, C. Dahlgren // FEMS Microbiology Letters. – 1987. – V. 44. – P. 135–140.

2. Cirillo S. L. G. Role of the Legionella pneumophila rtxA gene in amoebae / Cirillo et al. // Microbiology.– 2002.– V. 148.– P. 1667–1677.
3. Cosson P. Eat, kill or die: when amoeba meets bacteria / P. Cosson, T. Soldati // Current Opinion in Microbiology.– 2008.– V. 11.– P. 271–276.
4. Литвин В. Ю. Обратимый переход патогенных бактерий в покоящееся (некультивируемое) состояние: экологические и генетические механизмы / В. Ю. Литвин и др. // Вестник РАН.– 2000.– № 1.– С. 7-13.
5. Molmeret M. Amoebae as training grounds for intracellular bacterial pathogens / M. Molmeret et al. // Applied and Environmental Microbiology.– 2005.– V. 71.– С. 20–28.
6. Libby S. J. The Salmonella virulence plasmid spv genes are required for cytopathology in human monocyte-derived macrophages / S. J. Libby et al. // Cellular Microbiology.– 2000.– V. 2.– P. 49–58.
7. Jarvik T. Short-term signatures of evolutionary change in the Salmonella enterica serovar typhimurium 14028 genome / T. Jarvik et al. // Journal of Bacteriology.– 2009.– V. 192.– № 2.– P. 560–567.
8. Niyyatia M. A Review of the Current Research Trends in the Application of Medicinal Plants as a Source for Novel Therapeutic Agents Against Acanthamoeba Infections / M. Niyyatia, S. Dodangeha, J. Lorenzo-Morales // Iranian Journal of Pharmaceutical Research.– 2016.– V. 15.– № 4.– P. 893–900.
9. Douesnard-Malo F. Increased Persistence of Salmonella enterica Serovar Typhi in the Presence of Acanthamoeba castellanii / F. Douesnard-Malo, F. Daigle // Applied and environmental microbiology.– 2011.– V. 77.– № 21.– P. 7640–7646.
10. Kerby D. The simple difference formula: An approach to teaching nonparametric correlation / D. Kerby // Comprehensive Psychology.– 2014.– V. 3.– № 1.– P. 1–9.
11. Feng Y. Apoptosis-like cell death induced by Salmonella in Acanthamoeba rhyssodes / Y. Feng et al. // Genomics.– 2009.– V. 94.– № 2.– P. 132–137.
12. Tezcan-Merdol D. Uptake and Replication of Salmonella enterica in Acanthamoeba rhyssodes / D. Tezcan-Merdol et al. // Applied and Environmental Microbiology.– 2004.– V. 70.– P. 3706–3714.
13. Riquelme S. Relevant Genes Linked to Virulence Are Required for Salmonella Typhimurium to Survive Intracellularly in the Social Amoeba Dictyostelium discoideum [Электронный ресурс] / S. Riquelme et al. // Frontiers in microbiology.– 2016.– V. 7.– P. 1–10.– URL: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01305>
14. Anderl J. Role of Nutrient Limitation and Stationary-Phase Existence in Klebsiella pneumoniae Biofilm Resistance to Ampicillin and Ciprofloxacin / J. Anderl et al. // Antimicrobial agents and chemotherapy.– 2003.– V. 47.– № 4.– P. 1251–1256.

Сведения об авторах:

Балкин Александр Сергеевич, аспирант Института клеточного и внутриклеточного симбиоза УрО РАН
E-mail: balkinas@yandex.ru

Черкасов Сергей Викторович, директор Института клеточного и внутриклеточного симбиоза УрО РАН,
член-корреспондент РАН, доктор медицинских наук
E-mail: cherkasovsv@yandex.ru
460000, г. Оренбург, Ул. Пионерская, 11