

ВЛИЯНИЕ КОМПОНЕНТОВ КРОВИ НА АДГЕЗИОННУЮ АКТИВНОСТЬ НЕТУБЕРКУЛЕЗНЫХ МИКОБАКТЕРИЙ

В настоящее время все чаще у людей со сниженной иммунной компетентностью диагностируются заболевания, вызванные нетуберкулезными видами микобактерий (НТМБ). Наиболее распространенной формой заболеваний, связанных с НТМБ, являются инфекции, вызванные образованием биопленок на поверхности долговременных медицинских устройств. Однако, механизмы адгезии НТМБ на абиотических поверхностях при контакте с внутренними средами организма до сих пор остаются неясными.

Изучено влияние плазмы и гемоглобина крови человека, бычьей фетальной сыворотки (ФБС), сывороточного альбумина (БСА), фибронектина, ДНК, а также лизоцима и лактоферрина на адгезию *Mycobacterium smegmatis* mc² 155, *M. smegmatis* ГИСК 607, *M. avium* ГИСК 168 к полистиролу. Результаты показали, что присутствие в среде плазмы (10%), сыворотки (10%), альбумина (0,5 мг/мл), лизоцима (0,1 мг/мл) и лактоферрина (0,1 мг/мл) существенно снижали количество закрепленных на полистироле клеток микобактерий всех исследованных штаммов. Наибольший эффект подавления адгезионной активности микобактерий был выявлен в присутствии БСА и ФБС. Внесение ДНК крупного рогатого скота (0,5 мг/мл) в среду инкубации также приводило к значительному снижению количества закрепленных на полистироле бактерий. Однако, внесение в среду фибронектина (2,5 мкг/мл) и гемоглобина выявило гетерогенность среди НТМБ по способности связываться с поверхностью полистирола. Так, адгезия *M. smegmatis* ГИСК 607 и *M. avium* ГИСК 168 усиливалась в присутствии фибронектина и не изменялась для бактерий *M. smegmatis* mc² 155. Гемоглобин оказывал как ингибирующее (*M. smegmatis* mc² 155 и *M. avium* ГИСК 168), так и стимулирующее (*M. smegmatis* ГИСК 607) действие на адгезию НТМБ.

Выявленные данные о влиянии компонентов крови на прикрепление НТМБ к абиотической поверхности позволяют косвенно судить о процессах образования биопленок в условиях *in vivo*.

Ключевые слова: адгезия, альбумин, ДНК, нетуберкулезные микобактерии, сыворотка крови.

Микобактерии широко распространены в природе, часто встречаются в воде и почве. Долгое время считалось, что нетуберкулезные виды микобактерий (НТМБ) являются типичными сапрофитами. Однако в настоящее время все чаще диагностируются заболевания, вызванные бактериями этой группы [1], [2]. Есть предположение, что заражение человека и животных нетуберкулезными микобактериями происходит из окружающей среды. При этом НТМБ, содержащиеся в пылевых частицах воздуха и аэрозолях над природными водоемами могут играть важную роль в возникновении респираторных заболеваний. Источником распространения НТМБ является почва [3]. Представители НТМБ часто встречаются в водных источниках, бассейнах, а также в питьевой воде [2], [4]. Вследствие их, практически, повсеместного распространения, контакты человека и животных с представителями НТМБ неизбежны. Довольно часто происходит инфицирование этими бактериями

людей, входящих в определенные группы риска. К ним относятся люди со сниженной иммунной компетентностью в результате ВИЧ-инфекции, химиотерапии или иммуносупрессии, связанной с трансплантацией и ранее перенесенными заболеваниями легких.

Особенности строения наружных оболочек клеток микобактерий дает им дополнительные преимущества для выживания в агрессивных средах. Миколовые кислоты, окружающие клетки определяют их гидрофобность, слабую проницаемость и замедленный рост. В то же время, высокая гидрофобность способствует прикреплению к поверхностям и устойчивости к дезинфицирующим средствам и антибиотикам. Способность НТМБ формировать биопленки [5] имеет принципиальное значение для их успешного выживания в окружающей среде. Эта свойство также является ведущим фактором, способствующим патогенезу инфекций, связанных с долговременными медицинскими

устройствами (катетеры, имплантаты). Катетер-ассоциированные инфекции являются наиболее распространенной формой заболеваний, связанных с микобактериями [6], [7].

Инфекции, вызываемые НТМБ, имеют общее название – микобактериозы, и развиваются они в ослабленном организме. Известно, что для успешной колонизации тех или иных ниш, бактерии используют различные механизмы закрепления клеток на твердых поверхностях. Вместе с тем, в научной литературе практически отсутствуют данные, касающиеся механизмов адгезии НТМБ на абиотических поверхностях при контакте с внутренними средами организма человека или животных. В условиях *in vivo* непосредственное взаимодействие между бактериями и потенциально колонизируемой ими абиотической поверхностью играет минимальную роль, так как после контакта с кровью поверхность субстрата почти мгновенно покрывается белками сыворотки или тканей [8], [9]. В других природных средах бактерии, также прикрепляются, не непосредственно к субстрату, а к слою адсорбированных на его поверхности молекул, так называемой «кондиционной пленке». Кондиционная пленка из ионов, мономеров или полимеров изменяет свойства поверхностей и определяет степень бактериальной адгезии.

Целью настоящей работы явилось изучение влияния некоторых компонентов крови человека и животных на адгезию НТМБ к полистиролу.

Материалы и методы исследования

В качестве объектов исследования использовали штаммы бактерий *Mycobacterium smegmatis* mc² 155, *M. smegmatis* ГИСК 607, *M. avium* ГИСК 168. Выращивание бактерий проводили в колбах на питательной среде Luria-Bertani (LB) при перемешивании на шейкере при 150 об/мин и температуре 37°C в течение 40–48 ч. Культивирование микобактерий на жидкой среде LB сопровождалось образованием агрегатов клеток, для гомогенизирования которых применяли встряхивание на Multi Vortex V-32 в течение 15–20 мин с добавлением к культуре твина 60 до концентрации 0,1%. Затем готовили суспензию бактерий в свежей среде LB с оптической плотностью 0,15 при длине волны 600 нм (PD-303, “ApeI”, Япония). После чего полученные

суспензии разводили в 10 раз этой же питательной средой. Количество колониеобразующих единиц (КОЕ/мл) в полученных суспензиях соответствовало $1-1,5 \times 10^8$ КОЕ/мл.

Исследовали количественные показатели адгезии бактериальных клеток на поверхности полистироловых чашек Петри диаметром 40 мм («Медполимер», Санкт-Петербург).

Для исследования влияния компонентов крови в чашки Петри вносили по 200 мкл следующих растворов: бычий сывороточный альбумин (5 мг/мл, БСА, «Sigma»), гемоглобин (0,5 мг/мл), ДНК из селезенки крупного рогатого скота (5 мг/мл, «Олайнский завод химреактивов»), лактоферрин (1 мг/мл, «Sigma»), лизоцим из яичного белка (1 мг/мл, «Реахим»), плазмы крови человека, фетальной бычьей сыворотки («Биолот») и фибронектин (25 мкг/мл, «Sigma»). Гемоглобин получали из донорской крови путем гемолиза осадка эритроцитов в воде. Концентрацию гемоглобина определяли гемиглобиназидным методом [10]. Для получения плазмы цельную кровь здоровых доноров собирали в пробирки с ЭДТА («Improvacuter», Китай) и форменные элементы крови отделяли центрифугированием (3500g, 5 мин, 5415R, «Eppendorf»). Надосадочную жидкость использовали для эксперимента. После внесения исследуемых растворов в чашки Петри вносили по 1,8 мл приготовленной бактериальной суспензии. Инкубацию проводили в термостате при 37°C в течение 30 мин. По окончании инкубации удаляли жидкость с несвязавшимися клетками и чашки Петри трижды промывали бидистиллированной водой. Количество сорбированных клеток оценивали с помощью микровизора μ Viso-103 («Ломо») после окрашивания 0,1%-ным раствором кристаллического фиолетового, просматривая не менее 10 полей зрения в каждой чашке при увеличении $\times 1000$ раз. Подсчет количества бактерий в скоплениях клеток производили при увеличении $\times 2000$. Вычисляли среднее значение количества закрепленных бактерий в поле зрения микроскопа.

Результаты исследований

Результаты проведенных нами экспериментов показали, что из трех исследованных штаммов НТМБ бактерии *M. smegmatis* ГИСК 607 обладали наименьшей адгезионной актив-

ностью к поверхности полистирола. Среднее количество клеток в поле зрения микроскопа не превышало 10, тогда как бактерии штамма *M. smegmatis* mc² 155 отличались равномерным распределением по поверхности и значительным сродством к полистиролу. Отдельных клеток *M. avium* ГИСК 168 не было обнаружено на поверхности полистирола, наблюдалась адгезия небольших агрегатов сцепленных между собой бактериальных клеток (рис. 1).

При добавлении в среду инкубации бактериальных компонентов крови человека или животных, в ряде случаев, происходило существенное снижение количества адгезированных клеток (рис. 2).

Исключение составило лишь внесение в среду инкубации фибронектина, растворимого гликопротеина, который выполняет важную функцию при межклеточном взаимодействии в макроорганизме. Фибронектин повсеместно встречается в жидкостях организма человека и межклеточном пространстве разных типов клеток всех тканей и органов, включая клетки эпителия кишечника. Бактериальные патогены для успешного инфицирования имеют на поверхности клеток фибронектинсвязывающие белки, которые позволяют им успешно закрепляться во внутренних средах человека или животных [11]. Фибронектинсвязывающие белки обнаружены и у некоторых микобактерий, как туберкулезных, так и нетуберкулезных видов [12]. Выявленный нами эффект, связан с тем, что фибронектин не приводит к изменению гидрофобности поверхностей полистирола или бактериальных клеток [13].

Вероятнее всего, в данном случае проявляется гетерогенность по способности к свя-

зыванию различными микобактериями данного белка. Возможное наличие у *M. smegmatis* ГИСК 607 и *M. avium* ГИСК 168 фибронектинсвязывающих белков приводит к незначительному увеличению числа адгезированных бактерий.

Кроме того, наблюдалась активация адгезии бактерий *M. smegmatis* ГИСК 607 к полистиролу в присутствии гемоглобина (рис. 2, Б). Стимуляция колонизации гемоглобином показана для бактерий рода *Staphylococcus* [14]. Известно, что гемоглобин имеет области с высоким положительным зарядом, которые могут взаимодействовать с отрицательно заряженными молекулами на поверхности бактериальных клеток и, меняя активность поверхностных белков [15], влиять на интенсивность сродства бактерий к каким-либо материалам. В то же время, имеются данные, свидетельствующие о том, что гемоглобин может подавлять адгезию и колонизацию бактериями пространств посредством проявления антибактериального действия фрагментов гемоглобина [16].

В присутствии этого белка адгезия *M. smegmatis* mc² 155 и *M. avium* ГИСК 168 на полистироле снижалась более, чем в 2 раза (рис. 2 А, В). Однако, возможность антибактериального действия гемоглобина и его фрагментов на микобактерии требует специальных исследований.

Результаты, полученные при добавлении в среду инкубации НТМБ плазмы, сыворотки крови и её основного белка – альбумина – согласуются с известными данными о том, что эти компоненты значительно снижают бактериальную адгезию [13], [17]. Адгезия микобактерий всех исследованных нами штаммов существенно подавлялась в присутствии компонентов кро-

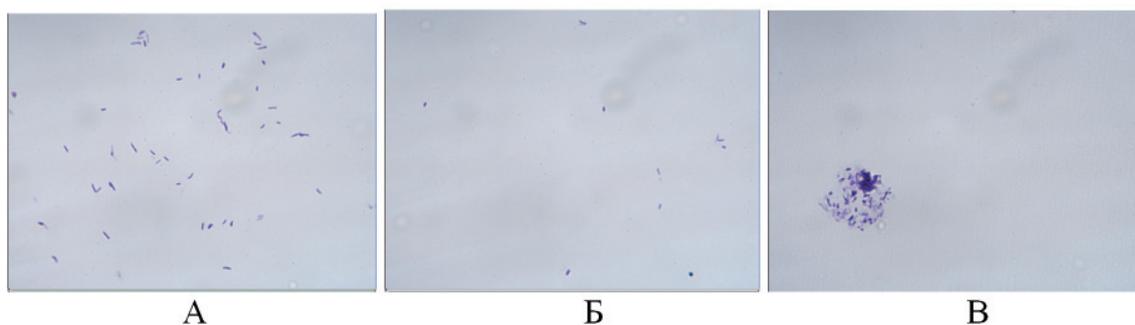


Рисунок 1 – Расположение клеток микобактерий в поле зрения микроскопа μ Viso-103 ($\times 1000$). А - *M. smegmatis* mc² 155, Б – *M. smegmatis* ГИСК 607, В - *M. avium* ГИСК 168

ви, наибольший подавляющий адгезию, эффект был выявлен в отношении *M. avium* ГИСК 168 (рис. 2 В).

Известно, что после контакта с кровью поверхность полимера практически мгновенно покрывается белками плазмы [18]. В исследованиях Ерошенко с соавт. убедительно показано, что наложение растворов плазмы и альбумина на поверхность полистирола приводят к существенному снижению его гидрофобности [13]. Адгезия микобактерий на полистироле вероятно, находится в выраженной зависимости от степени его гидрофобности. Это согласуется с утверждением о том, что основные механиз-

мы действия альбумина и плазмы на адгезию бактериальных клеток обусловлены сорбцией белковых соединений на поверхностях полимеров, сопровождающейся снижением их свободной энергии.

Внеклеточные нуклеиновые кислоты также обнаруживают в человеческой крови. Среднее количество ДНК, циркулирующей в плазме варьирует от 10 нг/мл до 1500 нг/мл и более [19]. Положительное влияние экзогенной бактериальной ДНК на адгезию к различным поверхностям продемонстрирована в отношении бактерий *Staphylococcus*, *Pseudomonas*, *Microbacterium* и *Serratia* [20]. Однако, практи-

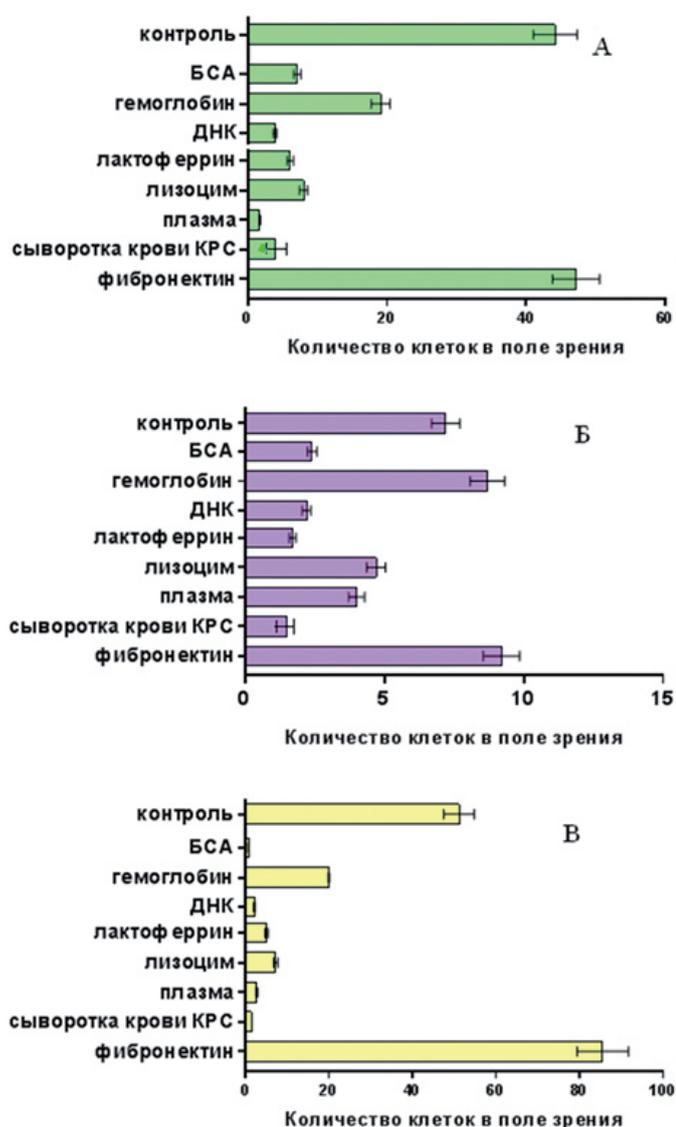


Рисунок 2 – Адгезия микобактерий к полистиролу в присутствии компонентов крови. А - *M. smegmatis* mc² 155, Б - *M. smegmatis* ГИСК 607, В - *M. avium* ГИСК 168

чески отсутствуют данные о влиянии чужеродной ДНК на процессы бактериальной адгезии. В экспериментах, проведенных с бактериями рода *Rhodococcus*, чужеродная ДНК лосося оказывала такое же стимулирующее действие, как и собственная [21], тогда как ДНК крупного рогатого скота не усиливала или подавляла адгезию стафилококков к полистиролу [22]. В наших экспериментах показано, что внесение ДНК крупного рогатого скота в среду инкубации бактерий приводит к существенному подавлению связывания микобактерий с полистиролом.

В настоящей работе было исследовано антиадгезионное действие факторов врожденного иммунитета человека и животных – лактоферрина и лизоцима. Субингибиторные концентрации этих белков оказывали выраженное,

ингибирующее действие на адгезию микобактерий к полистиролу. Эффекты лактоферрина хорошо изучены и показаны для предупреждения бактериальной адгезии на абиотических поверхностях [23]. Также активно изучается и действие лизоцима для предотвращения бактериальной колонизации абиотических поверхностей. В частности предложены варианты предобработки контактных линз для снижения адгезии стафилококков и псевдомонад на их поверхности [24].

Адгезия бактерий на биотических и абиотических поверхностях в организме хозяина является важнейшим шагом на пути к инфекции, поэтому антиадгезионная направленность воздействия на бактерий представляет собой потенциально перспективный путь лечения и профилактики микобактериозов.

04.10.2017

Список литературы:

1. Rapidly growing mycobacterial bloodstream infections / G. El. Helou, G.M. Viola, R.Hachem [et al] // *Lancet Infect. Dis.* - 2013. - V. 13. - P. 166-174.
2. Литвинов, В.И. Нетуберкулезные микобактерии в «Неживой и живой природе», заражение человека / В.И. Литвинов // *Туберкулез и социально-значимые заболевания.* – 2015. – № 2. – С. 28-33.
3. Relationships between Mycobacterium isolates from patients with pulmonary mycobacterial infection and potting soils / M.A. De Groot, N.R. Pace, K. Fulton [et al] // *Appl. Environ. Microbiol.* - 2006. - No. 72. - P. 7602-7606.
4. Mullis, S.N. Adherence and biofilm formation of Mycobacterium avium, Mycobacterium intracellulare and Mycobacterium abscessus to household plumbing materials / S.N. Mullis, J.O. Falkinham // *J. Appl. Microbiol.* - 2013. - V. 115, № 3. - P. 908-914.
5. Structural analysis of biofilm formation by rapidly and slowly growing non-tuberculous mycobacteria / M.M. Williams, M.A. Yakrus, M.J. Arduino [et al] // *Appl. Environ. Microbiol.* - 2009. - V.75. - No. 7. - P. 2091-2098.
6. Mycobacterium fortuitum prosthetic valve endocarditis: a case for the pathogenetic role of biofilms / S. Bosio, S. Leekha, S.I. Gamb [et al] // *Cardiovasc. Pathol.* - 2011. - V. 21. - P. 361-364.
7. Venous catheter-associated bacteremia caused by rapidly growing mycobacteria at a medical center in central Taiwan / C.Y. Chang, R.W. Tsay, L.C. Lin [et al] // *J. Microbiol. Immunol. Infect.* - 2009. - V. 42. - P. 343-350.
8. Fibronectin, fibrinogen, and laminin act as mediators of adherence of clinical staphylococcal isolates to foreign material / M. Herrmann, P.E. Vaudaux, D. Pittet [et al] // *J. Infect. Dis.* - 1988. - V. 158. - No. 4. - P. 693-701.
9. Modes of conformational changes of proteins adsorbed on a planar hydrophobic polymer surface reflecting their adsorption behaviors / R. Ishiguro, Y. Yokoyama, H. Maeda [et al] // *J. Colloid Interface Sci.* - 2005. - V. 290. - P. 91-101.
10. Турна А.А. Проблемы определения гемоглобина в лабораторной диагностике и меры её решения / А.А. Турна // *Лабораторная диагностика. Спецвыпуск «Лаборатория».* – 2013. - №3. - С. 48-53.
11. Hymes, J.P. Stuck in the Middle: Fibronectin-Binding Proteins in Gram-Positive Bacteria / J.P. Hymes, T.R. Klaenhammer // *Front. Microbiol.* - 2016. - V. 7. - P. 1504-1513.
12. Fibronectin-binding proteins secreted by Mycobacterium avium / H. Kitaura, N. Ohara, M. Naito [et al] // *APMIS.* - 2000. - V.107. - No. 9. - P. 558-564.
13. Eroshenko, D. The Role of Plasma, Albumin, and Fibronectin in Staphylococcus epidermidis Adhesion to Polystyrene Surface / D. Eroshenko, I. Morozov, V. Korobov // *Curr. Microbiol.* - 2015. - V.70. - P.846-853.
14. Hemoglobin promotes Staphylococcus aureus nasal colonization / M. Pynnonen, R.E. Stephenson, K. Schwartz [et al] // *PLoS Pathog.* - 2011. - V. 7. - No. 7. - P. 1-11.
15. Alpha and beta chains of hemoglobin inhibit production of Staphylococcus aureus exotoxins / P.M. Schlievert, L.C. Case, K.A. Nemeth [et al] // *Biochemistry.* - 2007. - V. 46. - No. 50. - P. 14349-58.
16. Antibacterial hemoglobin peptides in human menstrual blood / P. Mak, K. Wójcik, L. Wicherek [et al] // *Peptides.* - 2004. - V. 25. - No. 11. - P. 1839-1847.
17. Bacterial adherence to titanium surface coated with human serum albumin / T.J. Kinnari, L.I. Peltonen, P. Kuusela [et al] // *Otol. Neurotol.* 2005. - V. 26. - No. 3. - P. 380-384.
18. Quantitation and characterization of competitive protein binding to polymers / C.N. Cottonaro, H.V. Roohk, G. Shimizu [et al] // *Trans. Am. Soc. Artif. Intern. Organs.* - 1981. - V. 27. - P. 391-395.
19. Gahan, P.B. Circulating nucleic acids in plasma and serum. Recent developments / P.B. Gahan, R. Swaminathan // *Ann. N.Y. Acad. Sci.* - 2008. - V. 1137. - P.1-6.
20. Extracellular DNA in adhesion and biofilm formation of four environmental isolates: a quantitative study / L. Tang, A. Schramm, T.R. Neu [et al] // *FEMS Microbiol. Ecol.* - 2013. - V.86. - No. 3. - P. 394-403.
21. Gilan, I. Extracellular DNA Plays an Important Structural Role in the Biofilm of the Plastic Degrading Actinomycete *Rhodococcus ruber* / I. Gilan, A. Sivan // *Adv. Microbiol.* - 2013. - V. 3. - P. 543-551

22. Ерошенко, Д.В. Влияние факторов внешней среды на первые этапы образования биопленок бактериями *Staphylococcus epidermidis*: дис. ... канд. биол. наук. ИЭГМ УрО РАН, – Пермь, 2015. - 137 с.
23. Inhibition of initial bacterial adhesion on titanium surfaces by lactoferrin coating / F. Nagano-Takebe, H. Miyakawa, F. Nakazawa [et al] // *Biointerphases*. – 2014. - V. 9. - No.2. - P. 029006.
24. Influence of protein deposition on bacterial adhesion to contact lenses / L.N. Subbaraman, R. Borazjani, H. Zhu [et al] // *Optom. Vis. Sci.* - 2011. - V.88. - No. 8. - P. 959-966.

Сведения об авторах:

Полудова Татьяна Вячеславовна, научный сотрудник лаборатории биохимии развития микроорганизмов Института экологии и генетики микроорганизмов, доцент кафедры экологии факультета почвоведения, агрохимии, экологии и товароведения Пермской государственной сельскохозяйственной академии им. акад. Д.Н. Прянишникова, кандидат биологических наук, доцент
г. Пермь, ул. Голева, д. 13, e-mail: poludova@iegm.ru

Юркина Наталья Олеговна, студент кафедры химии и биотехнологии химико-технологического факультета Пермского национального исследовательского политехнического университета
г. Пермь, Комсомольский проспект, 29А, e-mail: optimistka-01@mail.ru

Ерошенко Дарья Владимировна, младший научный сотрудник лаборатории биохимии развития микроорганизмов, Институт экологии и генетики микроорганизмов, доцент кафедры химические технологии химико-технологического факультета Пермского национального исследовательского политехнического университета, кандидат биологических наук, доцент
г. Пермь, ул. Голева, д. 13, e-mail: dasha.eroshenko@gmail.com

Коробов Владимир Павлович, заведующий лабораторией биохимии развития микроорганизмов Института экологии и генетики микроорганизмов, доцент кафедры химии и биотехнологии химико-технологического факультета Пермского национального исследовательского политехнического университета, кандидат медицинских наук, доцент
г. Пермь, ул. Голева, д. 13, e-mail: korobov@iegm.ru