

Щуплова Е.А.

Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза УрО РАН, г. Оренбург, Россия
E-mail: Khanina83@yandex.ru

РОЛЬ МИКРОБОВ-АССОЦИАНТОВ В ПРОЦЕССАХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ БАКТЕРИЙ С ЭРИТРОЦИТАМИ

В последнее время все чаще встречаются работы, описывающие нахождение бактерий внутри эритроцитов. У разных микроорганизмов выработались различные типы стратегий взаимодействия с мембраной клетки-хозяина и различные механизмы проникновения внутрь клетки. Нахождение микроорганизмов в крови человека и животных, а также внутри эритроцитов приводит к развитию бактериемии и сепсису с высокой летальностью. В качестве гемокультуры при бактериемии в основном выделяют грамположительные микроорганизмы – коагулазонегативные стафилококки, второе место занимают энтеробактерии и другие условно-патогенные микроорганизмы, причем, выделенные гемокультуры представляют собой как моноинфекцию, так и ассоциацию из двух, трех и даже четырех возбудителей. Необходимо отметить, что изучение биологических свойств у микроорганизмов особенно актуально при обнаружении их в ассоциациях и тем более при взаимодействии бактерий с клетками организма человека, в частности с эритроцитами.

Использование современного метода конфокальной лазерной сканирующей микроскопии позволило изучить особенности взаимодействия эритроцитов с клетками *Staphylococcus epidermidis*, предварительно обработанных экзометаболитами микробов-ассоциантов. Результаты исследования показали, что экзометаболиты патогенного штамма *S. aureus*, а также супернатанты *Candida albicans* и *Klebsiella pneumoniae* усиливали процессы адгезии к эритроцитам клеток *S. epidermidis* и их внутриэритроцитарную локализацию. Под действием экзометаболических условно-патогенных микроорганизмов таких, как *S. saprophyticus*, *Escherichia coli* и *Corinebacterium spp.* наблюдали снижение изучаемых процессов.

Таким образом, под влиянием экзометаболических бактерий-ассоциантов было обнаружено разнонаправленное действие на процессы адгезии и проникновения в эритроциты клеток *Staphylococcus epidermidis*.

Ключевые слова: микробы-ассоцианты, экзометаболиты, эритроциты, взаимодействия.

Проникновение одноклеточных организмов внутрь клеток других – явление, достаточно широко распространенное у бактерий, простейших и грибов. Около 20 бактериальных таксонов содержат виды, которые являются внутриклеточными паразитами и вызывают такие серьезные заболевания человека и животных, как туберкулез, бруцеллез, дизентерию и др. [7]. В последнее время все чаще можно встретить работы, где описывают нахождение микроорганизмов внутри эритроцитов, например, такие бактерии, как *Bartonella bacilliformis* [9], *B. quintana* [9], *Streptococcus pneumoniae* [11], *Mycoplasma suis* [10], *Staphylococcus epidermidis* [8]. У разных бактерий выработались различные типы стратегий взаимодействия с мембраной клетки-хозяина и различные механизмы проникновения внутрь клетки. Разные группы бактерий могут поражать различные типы клеток, в основном эпителиальные, дендритные клетки и макрофаги [7]. Розов С.М. и Дейнеко Е.В. в обзоре представили два механизма проникновения патогенов внутрь клеток, включая неспособных к фагоцитозу (эритроциты) [7]. При проникновении по механизму застежки-молнии

(zipper) происходит тесное связывание бактерий с мембраной клетки-хозяина (эритроцит) и дальнейшее ее скольжение по мембране, которое заканчивается формированием вакуоли, переносающей бактерию внутрь клетки. Триггерный механизм инвазии запускается бактериальными эффекторами, впрыскиваемыми в цитозоль клетки-хозяина [7]. Нахождение микроорганизмов в крови человека, а также внутри эритроцитов приводит к развитию бактериемии и сепсису с высокой летальностью [10]. Чаще встречаются работы, описывающие роль коагулазонегативных стафилококков, энтеробактерий и других условно-патогенных бактерий в развитии бактериемии [3], [10], причем выделенные гемокультуры представляют собой как моноинфекцию, так и ассоциацию из двух, трех и даже четырех возбудителей [3]. Ранее [8] были получены данные о взаимодействии эритроцитов с клетками *S. epidermidis* и *Escherichia coli*, однако, влияние микробов-ассоциантов на процессы взаимодействия бактерий с эритроцитами изучено недостаточно. Целью настоящей работы явилось изучение особенностей взаимодействия эритроцитов с клетками *S. epidermidis*,

предварительно обработанных экзометаболитами микробов-ассоциантов.

Материалы и методы

В данном исследовании использовали штаммы *S. epidermidis* 7 и 13, отличавшиеся уровнем антигемоглобиновой активности (АнтиHbA), взятые из рабочей коллекции лаборатории экологии микроорганизмов ИКВС УрО РАН. Штамм *S. epidermidis* 7 характеризовался высоким уровнем (18,3 г/л) АнтиHbA, тогда как *S. epidermidis* 13 – низким уровнем (0,5 г/л) данной активности [2]. Для создания модели ассоциаций микроорганизмов были отобраны ассоцианты (штаммы *S. aureus*, *S. saprophyticus*, *Escherichia coli*, *Candida albicans*, *Klebsiella pneumoniae* и *Corynebacterium spp.*). Бактерии выращивали на Шедлер-агаре (HiMedia, India) при 37 °С в течение 24 ч. Далее в полученные бактериальные взвеси *S. epidermidis* 7 и 13 (1 млрд. КОЕ/мл) добавляли стерильные супернатанты (экзометаболиты) штаммов-ассоциантов и инкубировали 24 ч при 37 °С. Для изучения процессов взаимодействия бактерий с эритроцитами, в частности, адгезии исследуемых бактериальных клеток *S. epidermidis* 7 и 13 к эритроцитам и их внутриэритроцитарное проникновение добавляли взвесь эритроцитов. Для этого полученные исследуемые образцы объемом 1 мл отмывали фосфатно-солевым буфером с помощью центрифугирования и смешивали с отмываемым буферным раствором эритроцитами в концентрации 10^6 кл/мл объемом 0,5 мл. После чего во все пробы добавляли по 1 мл питательной среды RPMI-1640 (ООО «БиолоТ», Санкт-Петербург). В качестве контроля I использовали смесь эритроцитов (0,5 мл) со стафилококками (по 1 мл) в 1 мл среды RPMI-1640; контроль II – эритроциты (0,5 мл) в 1 мл физиологического раствора и 1 мл среды RPMI-1640; контроль III – эритроциты (0,5 мл), 1 мл супернатантов бактерий-ассоциантов и 1 мл среды RPMI-1640. Опытные и контрольные пробы инкубировали в течение 24 ч при 37 °С. Затем исследуемые образцы подготавливали [8] для конфокальной лазерной сканирующей микроскопии (КЛСМ), которую проводили на базе *Rhodococcus*-центра Пермского государственного национального исследовательского университета. Визуализацию клеток эритроцитов осуществляли с по-

мощью микроскопа Olympus FV 1000 (Olympus Corporation, Япония) с использованием 100 х иммерсионного объектива (числовая апертура 1,4). Для возбуждения флуоресценции флуоресцеинизотиоцианада и синьки Эванса применяли аргоновый лазер ($\lambda = 488$ нм) с 505/525-нм барьерным фильтром и гелий-неоновый лазер ($\lambda = 543$ нм) с 560/660-нм барьерным фильтром, соответственно. Изображения размером 0,12 x 0,12 мм (с разрешением 512 x 512 пикселей) получали с использованием 1,4 мегапиксельной цифровой камеры со скоростью 12,5 нм/пиксель. Обработку полученных изображений осуществляли с помощью программ FV10-ASW 3.1 (Olympus Corporation, Япония). Адгезивную активность клеток *S. epidermidis* 7 и 13 определяли по аналогии с фагоцитарным показателем [6], а внутриэритроцитарное расположение рассчитывали по формуле фагоцитарного числа [6].

Полученные результаты статистически обработали с вычислением средней арифметической (M); стандартной ошибки (m). Для установления доказательности различий (p) использовали критерий значимости (t) Стьюдента, различия считались значимыми (достоверными) при $p < 0,05$ [5].

Результаты и обсуждение

В результате работы было выявлено, что самый высокий процент адгезии к эритроцитам оказался у клеток *S. epidermidis* как с высоким, так и с низким уровнем АнтиHbA, обработанных экзометаболитами *S. aureus*, что составило $40,3 \pm 2,8$ и $32,5 \pm 2,4$ (%). Под действием экзометаболитов *C. albicans* и *K. pneumoniae* наблюдали усиление в 2,5 раза адгезивной активности штамма *S. epidermidis* 7 к эритроцитам, чем штамм *S. epidermidis* 13, что составило $31,7 \pm 2,3$ и $28,5 \pm 2,2$ (%) против $13,5 \pm 1,6$ и $11,6 \pm 1,5$ (%) соответственно. Под действием экзометаболитов *S. saprophyticus*, *E. coli* (рис. 1) и *Corynebacterium spp.* у клеток *S. epidermidis* 7 и 13 наблюдали снижение показателей адгезии к эритроцитам, даже ниже контрольных значений.

Аналогичные результаты были получены при изучении внутриэритроцитарной локализации клеток *S. epidermidis* 7 и 13, обработанных экзометаболитами *S. aureus* (рис. 2) и *C. albicans*. Необходимо отметить, что под действием эк-

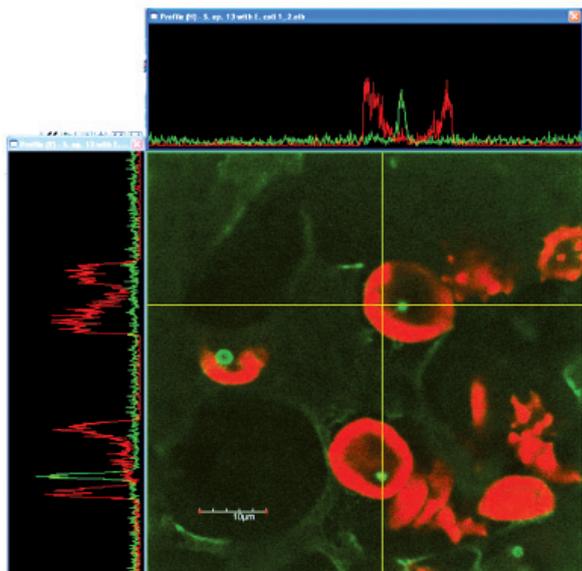


Рисунок 1 – КЛСМ-изображения эритроцитов с адгезированными клетками *S. epidermidis* 7, обработанными экзометаболитами ассоцианта *E. coli*.
*Примечание: Клетки, светящиеся красным цветом (синька Эванса) – эритроциты, зеленым (флуоресцеинизотиоцианат) – стафилококки

зометаболитов патогенного штамма *S. aureus*, в эритроцитах наблюдали до четырех кокков, что ранее не было отмечено.

Клетки *S. epidermidis* 7 с высоким уровнем АнтиНвА, обработанные экзометаболитами *S. saprophyticus* и *E. coli* в 1,5 раза реже проникали в эритроциты, чем обработанные супернатантом *S. aureus*. Штамм *S. epidermidis* 13, обработанный экзометаболитами *S. saprophyticus* в 3,2 раза реже наблюдали внутри эритроцитов, чем клетки, обработанные супернатантом *S. aureus* и в контроле. Необходимо отметить, что после обработки клеток *S. epidermidis* 7 и 13 экзометаболитами *Corynebacterium spp.* внутри эритроцитов их не обнаружили.

Заключение

Таким образом, полученные результаты в данном исследовании показали, что межмикробные взаимодействия оказывают разнонаправленное влияние на процессы адгезии и проникновения в эритроциты. После воздействия экзометаболитами условно-патогенных штаммов таких, как *S. saprophyticus*, *E. coli* и *Corinebacterium spp.* на клетки стафилококков выявили понижение их адгезивной активности

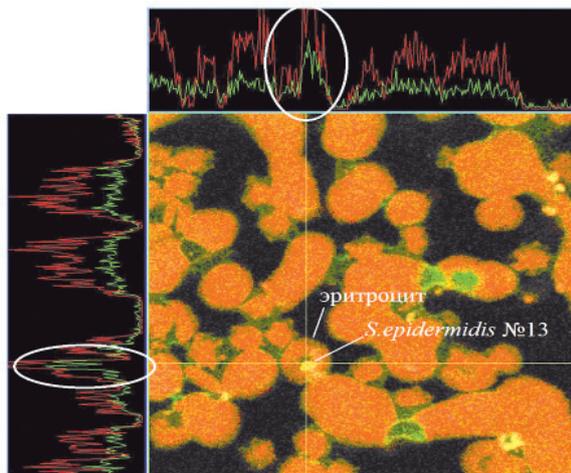


Рисунок 2 – КЛСМ-изображения эритроцитов с расположенными внутри клетками *S. epidermidis* 13, обработанными экзометаболитами ассоцианта *S. aureus**

*Примечание: Клетки, светящиеся красным цветом (синька Эванса) – эритроциты, зеленым (флуоресцеинизотиоцианат) – стафилококки. Белые линии на КЛСМ-изображении соответствуют графикам флуоресцентных сигналов (слева и сверху)

к эритроцитам, а также внутриэритроцитарную локализацию. Под действием экзометаболитов *C. albicans* и *K. pneumoniae*, напротив, наблюдали усиление адгезии к эритроцитам, причем только одного штамма *S. epidermidis* 7 – с высоким уровнем антигемоглобиновой активности. Необходимо отметить, что экзометаболиты патогенного штамма *S. aureus* значительно повышали не только адгезию клеток *S. epidermidis* как с высоким, так и с низким уровнем АнтиНвА, но и наблюдали более частое их внутриэритроцитарное проникновение. Под действием экзометаболитов *Corynebacterium spp.* внутриэритроцитарного проникновения клеток стафилококков не обнаружено. Полученные данные нашли подтверждение в работах других авторов [1], [4].

Козволюция прокариот и эукариотических организмов привела к возникновению большого числа бактериальных факторов, способных манипулировать функциями хозяина. В конечном итоге, относительно простые микроорганизмы разработали сложные, порой изощренные стратегии проникновения в клетку организма человека, выживания в ней и перестраивания клетки под свои нужды [7].

06.10.2017

Список литературы:

1. Ассоциативный симбиоз. / О.В. Бухарин [и др.] Екатеринбург: УрО РАН, 2007. - 264 с.
2. Бухарин, О.В. Определение антигемоглобиновой активности микроорганизмов / О.В. Бухарин, Б.Я. Усвяцов, Е.А. Ханина // Патент РФ № 2262705 – С. 2.
3. Каргальцева, Н.М. Полимикробность гемокультур – современная тенденция в этиологии инфекции кровотока / Н.М. Каргальцева, В.И. Кочеровец, А.М. Иванов // Инфекционные болезни и антимикробная терапия. - 2012. - Т. 56. - № 1. С. 56-61.
4. Значимость факторов патогенности условно-патогенных микроорганизмов при оценке их этиологической роли в развитии заболевания / Е.С. Кунилова [и др.] // Инфекция и иммунитет. - 2012. – Т. 2. - № 4. - С. 699-704.
5. Ланг, Т.А. Как описывать статистику в медицине. Аннотированное руководство для авторов, редакторов и рецензентов / Т.А. Ланг, М. Сесик / пер. с англ. под ред. В.П. Леонова. М. Практическая медицина, 2011. - 245 с.
6. Карпищенко, А.И. Медицинские лабораторные технологии и диагностика: Справочник. Медицинские лабораторные технологии / Под ред. проф. А.И. Карпищенко. С-Пб. Интермедика, 1999. - 656 с.
7. Розов, С.М. Бактериальные внутриклеточные патогены: стратегии нападения и защиты / С.М. Розов, Е.В. Дейнеко // Успехи современной биологии. - 2015. – Т. 135. - № 5. - С. 464-479.
8. Щуплова, Е.А. Роль биологических свойств *Staphylococcus epidermidis* во внутриэритроцитарной инвазии и изменении активности каталазы и супероксиддисмутазы эритроцитов при экспериментальной генерализованной инфекции / Е.А. Щуплова, А.А. Стадников, С.Б. Фадеев // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. - 2015. – Т. 159. - № 1. - С. 79-82.
9. Dechio, C. Infection-associated type IV secretion systems of *Bartonella* and their diverse roles in host cell interaction / C. Dechio // Cell Microbiol. - 2008. – No. 10(8). - P. 1591–1598.
10. Marnie Potgieter, J. The dormant blood microbiome in chronic, inflammatory diseases / Marnie Potgieter, J. Bester, D. B. Kell // Microbiology Reviews. - 2015. – Vol. 13. – No. 39. - P. 567–591.
11. *Streptococcus pneumoniae* invades erythrocytes and utilizes them to evade human innate immunity / M. Yamaguchi [et al.] // PLoS One. - 2013. – No. 8. - P. 77282.

Сведения об авторе:

Щуплова Елена Алексеевна, старший научный сотрудник лаборатории экологии микроорганизмов Института клеточного и внутриклеточного симбиоза УрО РАН, кандидат биологических наук
460000, г. Оренбург, ул. Пионерская, 11; тел. 8 (3532) 77-54-17, e-mail: Khanina83@yandex.ru