

Е.В.Пименов<sup>1,2</sup>, В.А.Оборин<sup>3</sup>, А.Г.Ивонин<sup>1,2</sup>

## ИССЛЕДОВАНИЕ МЕХАНИЗМОВ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ БАКТЕРИЙ ВАКЦИННОГО ШТАММА *YERSINIA PESTIS* EV НИИЭГ С ЭРИТРОЦИТАМИ ЧЕЛОВЕКА

<sup>1</sup>Лаборатория сравнительной кардиологии Коми НЦ УрО РАН, Сыктывкар;  
<sup>2</sup>ФГБОУ ВПО «Вятская государственная сельскохозяйственная академия», Киров;  
<sup>3</sup>ФГБОУ ВПО «Вятский государственный гуманитарный университет», Киров

В сравнительных экспериментах установлена сильная корреляционная связь между показателем адгезии штамма *Yersinia pestis* EV НИИЭГ к эритроцитам человека и гидрофобными свойствами бактерий, в то же время зависимости между гемагглютинирующей способностью и адгезивностью чумного микроба не обнаружено. Выявлено, что обработка культуры бактерий трипсином и воздействие на нее высокой температуры (56 °С) приводят к снижению адгезии. Показано, что инкубация микробных клеток с эритроцитами в присутствии антибиотиков (ампициллин, гентамицин, доксициклин и цефотаксим) не влияет на их взаимодействие. Результаты проведенных исследований позволяют предположить, что основная роль в адгезии штамма *Y. pestis* EV НИИЭГ к эритроцитам человека принадлежит гидрофобным взаимодействиям, которые обусловлены поверхностными структурами микробных клеток, относящимися к липопротеидам.

**Ключевые слова:** штамм *Y. pestis* EV НИИЭГ, эритроциты, механизм взаимодействия, адгезия, гидрофобность, гемагглютинация, трипсин, антибиотики.

E.V.Pimenov<sup>1,2</sup>, V.A.Oborin<sup>3</sup>, A.G.Ivonin<sup>1,2</sup>

### Investigation of Mechanisms of Interaction of *Yersinia pestis* EV NIEG Vaccine Strain Bacteria with Human Red Blood Cells

<sup>1</sup>The Laboratory of Comparative Cardiology of the Komi Research Centre of the RAMS Ural Division, Syktyvkar;  
<sup>2</sup>Vyatka State Agricultural Academy, Kirov; <sup>3</sup>Vyatka State University, Kirov

The comparative experiments demonstrated strong correlation between the index of *Yersinia pestis* EV NIEG strain adhesion to human red blood cells and hydrophobic properties of bacteria. At the same time no dependence between hemagglutination and adhesion of plague microbe was determined. Bacterial culture treatment with trypsin and high temperature (56 °С) decreased adhesion. Incubation of microbial cells with red blood cells in the presence of antibiotics (ampicillin, gentamycin, doxycycline and cefotaxime) had no influence on their interaction. The results of investigations suggested the major role of hydrophobic interactions in *Y.pestis* EV NIEG strain adhesion to human red blood cells provided by the surface structures of microbial cells of the lipoprotein origin.

**Key words:** *Y.pestis* EV NIEG strain, red blood cells, mechanism of interaction, adhesion, hydrophobic properties, hemagglutination, trypsin, antibiotics.

Прикрепление бактерий к эукариотическим клеткам представляет собой сложный процесс, обусловленный как физико-химическими взаимодействиями их поверхностей, так и более тонкими молекулярными взаимодействиями между адгезинами микробных клеток и специфическими рецепторами мембраны клеток-мишеней [1, 2, 5, 6, 12].

По мнению ряда исследователей [2, 10, 11, 13], на начальной стадии адгезии бактерий к субстрату определяющую роль играет гидрофобность их поверхности. В связи с этим сравнительное изучение гидрофобных и адгезивных свойств чумного микроба может позволить установить механизмы его взаимодействия с клетками макроорганизма. В работе представлены результаты определения гидрофобных свойств и адгезивной активности клеток *Y. pestis* EV НИИЭГ, выращенных в различных условиях, в отношении эритроцитов человека.

Для выяснения природы поверхностных структур бактерий *Y. pestis* EV НИИЭГ, участвующих в прикреплении к эритроцитам, микробную культуру подвергали различным воздействиям, после чего

оценивали ее адгезивные свойства. Полученные в ходе экспериментов данные и их обсуждение приводятся ниже.

### Материалы и методы

В исследованиях использовали бактерии штамма *Y. pestis* EV НИИЭГ, выделенные из коммерческой чумной живой сухой вакцины. Микробные клетки выращивали на ГРМ-агаре, агаре Хоттингера и мясопептонном агаре (рН 7,2) в течение 48 ч. В качестве дополнительных ингредиентов использовали сульфит натрия (1:30000) и генцианвиолет (1:100000). Бактерии суспендировали в 0,9 % растворе хлорида натрия (рН 7,2). Конечная концентрация клеток в суспензии соответствовала 1,0 у.е. оптической плотности при длине волны проходящего света 540 нм и длине оптического пути кюветы 5 мм. Для измерения оптической плотности суспензии применяли фотоэлектроколориметр КФК-2.

Эритроциты получали из венозной крови донора 0(I) Rh<sup>+</sup> группы крови. В качестве антикоагулянта

применяли 3,8 % раствор лимонно-кислого натрия (1:10). Не позднее 24 ч после взятия крови эритроциты трижды отмывали десятикратным объемом 0,9 % раствора хлорида натрия (рН 7,2) путем центрифугирования при 1000 об/мин в течение 5 мин и ресуспендировали в этом же растворе. Конечная концентрация эритроцитов в суспензии составляла  $1,0 \cdot 10^{12}/л$ .

Адгезивную активность микробных культур определяли с помощью разработанного авторами фотоколориметрического метода [7, 8]. Гидрофобность бактерий оценивали по степени их адсорбции на поверхности капель хлороформа [9]. Гемагглютинирующую активность микробных клеток определяли по методике [4].

При трипсинизации микробной культуры бактерии суспендировали в 0,5 % растворе трипсина, приготовленном на 0,9 % растворе хлорида натрия (рН 7,2), и инкубировали в течение 1–3 ч при  $(37 \pm 1)^\circ C$ . Затем клетки дважды отмывали от трипсина 0,9 % раствором хлорида натрия (рН 7,2) путем центрифугирования при 4000 об/мин в течение 10 мин и ресуспендировали в этом же растворе. При оценке влияния высокой температуры на адгезивную способность штамма суспензию бактерий прогревали при  $(56 \pm 1)^\circ C$  в течение 5, 10, 20 и 30 мин.

В каждой серии опытов выполняли по пять независимых определений, статистическую обработку полученных данных проводили с помощью компьютерной программы для обработки медицинской информации «Biostat 4.03».

### Результаты и обсуждение

На первом этапе работы проводили сравнение адгезивной активности и гидрофобных свойств культур *Y. pestis* EV НИИЭГ, выращенных на ГРМ-агаре при различной температуре. Микробные клетки, культивируемые при  $(20 \pm 1)$  и  $(28 \pm 1)^\circ C$  и обладающие выраженными адгезивными свойствами, проявляли достаточно высокую гидрофобность (значения ПГ составляли 38–44 %). У культуры, выращенной при  $(37 \pm 1)^\circ C$  и характеризующейся низкой адгезивностью, гидрофобные свойства были выражены относительно слабо – ПГ находился на уровне 8 %.

Из литературы [3] известно, что в составе клеток штамма *Y. pestis* EV НИИЭГ, выращенных при температуре  $(37 \pm 1)^\circ C$ , обнаруживается на два белка меньше, чем у бактерий, инкубированных при низкой температуре. Вероятно, именно эти белки придают клеткам более выраженную гидрофобность и участвуют в их прикреплении к эритроцитам.

Последующие эксперименты показали, что гидрофобность и адгезивные свойства микробных клеток зависят не только от температуры культивирования, но и от состава питательной среды (табл. 1).

При выращивании бактерий на агаре Хоттингера их адгезивные и гидрофобные свойства были значительно выше, чем при выращивании на мясопептонном агаре. При этом добавление в состав мясопеп-

Таблица 1

Показатели адгезии и гидрофобности бактерий *Y. pestis* EV НИИЭГ, выращенных при  $(28 \pm 1)^\circ C$  на питательных средах различного состава (n=5)

Дополнительные ингредиенты	Питательная среда			
	мясопептонный агар		агар Хоттингера	
	ПА, %	ПГ, %	ПА, %	ПГ, %
Отсутствуют	35,93±3,87	15,26±3,34	59,67±3,81	27,44±3,32
Сульфит натрия	29,24±4,75	13,52±3,02	74,48±2,71	30,48±3,48
Генцианвиолет	34,26±4,48	16,95±3,75	78,21±3,21	29,15±3,57
Сульфит натрия + генцианвиолет	38,97±9,19	15,72±3,96	76,63±2,97	32,26±0,77

тонного агара сульфита натрия и генцианвиолета не оказывало значительного влияния на адгезивность и гидрофобность микробных клеток, в то же время внесение этих ингредиентов в агар Хоттингера приводило к значительному повышению уровня адгезии и в меньшей степени – гидрофобности испытуемой культуры. Между значениями ПА и ПГ микробных культур выявили высокую степень корреляционной связи ( $r=0,9$ ), что позволило предположить о важной роли гидрофобных взаимодействий в процессе адгезии клеток *Y. pestis* EV НИИЭГ к эритроцитам человека.

На следующем этапе исследований изучили взаимосвязь гемагглютинирующей способности штамма *Y. pestis* EV НИИЭГ с его адгезивными свойствами. При этом было показано, что два данных свойства проявлялись независимо друг от друга (табл. 2). Следовательно, РГА не позволяла раскрывать адгезивную способность исследуемого штамма. В этом плане преимуществами обладала методика, предложенная авторами.

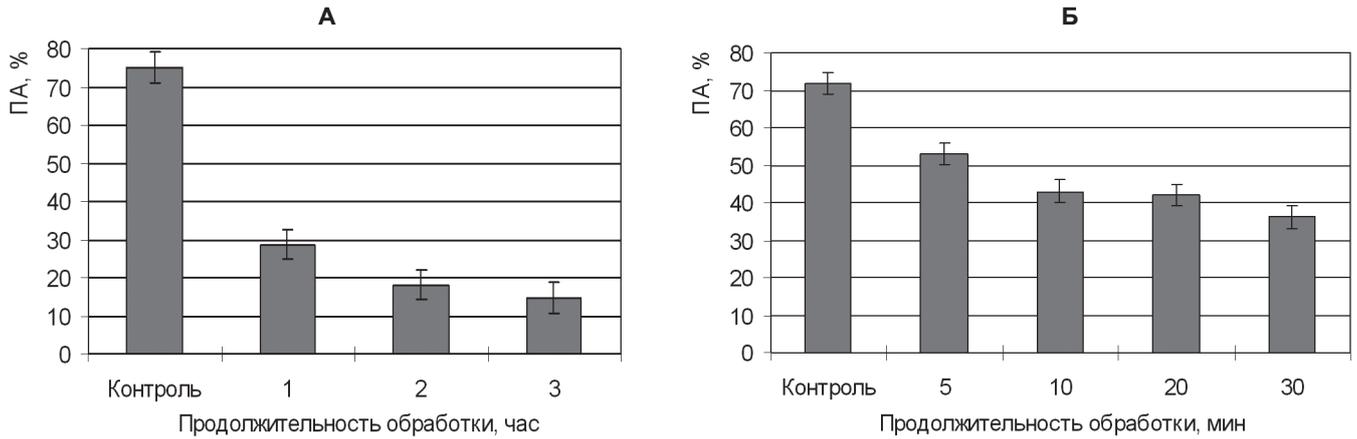
В дальнейшем для установления состава структур клеток *Y. pestis* EV НИИЭГ, ответственных за адгезию к эритроцитам, провели эксперименты, заключающиеся в воздействии на микробную культуру различными экзогенными факторами (трипсином, высокой температурой, антибиотиками) и последующей оценке уровня адгезии. Установили (рисунок), что обработка бактерий трипсином в течение 1–3 ч приводила к снижению интенсивности адгезии в 2,6–5,1 раза, а прогревание в течение 5–30 мин – в 1,3–1,9 раза по сравнению с интактными бактериями.

Полученные результаты свидетельствовали о белковой природе факторов, обеспечивающих фиксацию чумного микроба к эритроцитам. Тем не менее, под воздействием высокой температуры и ферментативной обработки бактерий их адгезивная

Таблица 2

Адгезивные и гемагглютинирующие свойства культур *Y. pestis* EV НИИЭГ, выращенных при различной температуре на ГРМ-агаре (n=5)

Показатели (M±m)	Температура выращивания микробной культуры, $^\circ C$		
	20±1	28±1	37±1
ПА, %	57,44±1,18	76,68±2,32	14,57±1,85
Титр РГА	1:96,0±32,0	1:266,7±138,7	1:277,3±129,8



Показатели адгезии клеток *Y. pestis* EV НИИЭГ к эритроцитам человека после обработки трипсином (А) и прогревания (Б) (n=5)

способность полностью не исчезала. Вероятно, что в прикреплении чумного микроба к эритроцитам, помимо поверхностных белков, участвуют и другие субстанции. Учитывая корреляцию гидрофобности и адгезивности клеток *Y. pestis* EV НИИЭГ, можно предположить, что структуры, ответственные за связывание бактерий с чувствительными клетками, являются липопротеидами.

В заключительной серии экспериментов оценили влияние ряда антибиотиков (ампициллина, гентамицина, доксициклина и цефотаксима) на способность клеток *Y. pestis* EV НИИЭГ прикрепляться к эритроцитам человека.

Препараты применяли в субтерапевтических и терапевтических концентрациях (создаваемых в сыворотке крови при внутривенном введении терапевтических доз): гентамицин и доксициклин – 3,0 и 6,0 мкг/мл, ампициллин – 10,0 и 20,0 мкг/мл, цефотаксим – 40,0 и 100,0 мкг/мл соответственно. Использовали различные варианты внесения антибиотиков в пробы: добавление к бактериям непосредственно перед их смешиванием с эритроцитами с последующей инкубацией проб на вращающейся платформе при (37±1) °С в течение 30 мин; предварительную 30-минутную обработку бактерии/эритроцитов при (37±1) °С на вращающейся платформе с последующим добавлением необработанных эритроцитов/бактерий. Результаты эксперимента показали, что тестируемые антибактериальные препараты не вызвали достоверных изменений уровня адгезии микробных клеток.

Таким образом, нами проведены сравнительные исследования адгезивных, гемагглютинирующих и гидрофобных свойств штамма *Y. pestis* EV НИИЭГ. Между гидрофобностью бактерий и их адгезивной способностью в отношении эритроцитов выявлена сильная корреляционная связь. Следовательно, в адгезии данного штамма к клеткам-мишеням важная роль принадлежит гидрофобным взаимодействиям. В то же время какой-либо зависимости между адгезивностью и гемагглютинирующей активностью микробных клеток не выявлено, что не позволяет ис-

пользовать РГА для оценки адгезии чумного микроба к эритроцитам. Установлено, что обработка трипсином и воздействие высокой температуры (56 °С) приводит к снижению адгезивных свойств микробных клеток. Поэтому можно предположить, что структуры, отвечающие за процесс взаимодействия чумного микроба с эритроцитами, принадлежат к липопротеидам. Для подтверждения этого необходимы дальнейшие исследования. Показано, что антибиотики (ампициллин, доксициклин, гентамицин, цефотаксим) не влияют на адгезию *Y. pestis* EV НИИЭГ к эритроцитам человека.

Работа выполнена при поддержке программы фундаментальных исследований УрО РАН, проект № 12-П-4-1069 «Функционирование сердечно-сосудистой системы в условиях кислородной недостаточности».

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бондаренко В.М., Gang W., Barcus M.M. Адгезивная активность клинических штаммов клебсиелл. Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 1996; 2:104–9.
2. Езепчук Ю.В. Патогенность как функция биомолекул. М.: Медицина; 1985. 240 с.
3. Зюзина В.П., Демидова Г.В., Соколова Е.П., Беспалова И.А., Бородин Т.Н., Алексеева Л.П. и др. Сравнение спектра белков, присутствующих в препаратах липополисахаридов *Yersinia pestis*, выращенных при 28 и 37 °С. Биотехнология. 2003; 3:20–4.
4. Костюкова Н.Н., Переверзев Н.А. Адгезия у *Corynebacterium diphtheriae*. Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 1985; 11:30–2.
5. Костюкова Н.Н. Начальный этап инфекционного процесса – колонизация и пути ее прекращения. Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 1989; 9:103–10.
6. Макаренкова И.Д., Компанец Г.Г., Запорожец Т.С. Ингибирование адгезии патогенных микроорганизмов на эукариотических клетках. Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 2006; 3:121–5.
7. Оборин В.А., Ивонин А.Г., Пименов Е.В., Романов В.Е., Абашева Ф.И., Вылегжанина О.В. Изучение адгезии клеток вакцинного штамма EV *Yersinia pestis* к эритроцитам человека фотокolorиметрическим методом. Вестник НГУ. Сер.: Биол., клин. мед. 2009; 7(3):25–9.
8. Романов В.Е., Ивонин А.Г., Бондаренко А.Л., Оборин В.А., Нехорошкина Е.Л. Способ определения бактериофиксирующей активности эритроцитов. Патент 2360969 РФ, опубл. 10.07.2009 г. Бюл. № 11.
9. Серебрякова Е.В., Дармов И.В., Медведев Н.П., Алексеев С.А., Рыбак С.И. Оценка гидрофобных свойств бактериальных клеток по адсорбции на поверхности капель хлороформа. Микробиология. 2002; 71(2):237–9.
10. Федорович В.В., Калужный С.В., Ван-дер-Мурен П.,

Верстрам В. Разработка феноменологической модели кинетики бактериальной адсорбции на низкоэнергетических поверхностях. Вестник Московского ун-та. Сер. 2. Химия. 2002; 43(6):417–20.

11. Яскович Г.А., Яковлева Е.П. Изучение гидрофобности поверхности штаммов клеток бактерий. Микробиология. 1996; 65(4):565–71.

12. Jones C.H., Jones C.H., Pinkner J.S., Roth R., Heuser J., Nicholes A.V. et al. FimH adhesin of type 1 pili is assembled into a fibrillar tip structure in the *Enterobacteriaceae*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1995; 92(2):2081–5.

13. Rosenberg M., Gutnick D., Rosenberg E. Adhrence of bacteria to hydrocarbons: a simple method for measuring cell-surface hydrophobity. FEMS Microbiol. Lett. 1980; 9(1):29–33.

#### References (Presented are the Russian sources in the order of citation in the original article)

1. Bondarenko V.M., Gang W., Barcus M.M. [Adhesion activity of clinical strains of *Klebsiella*]. Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol. 1996; 2:104–9.

2. Ezechuk Yu.V. [Pathogenicity as a Function of Biomolecules]. M.; 1985. 240 p.

3. Zyuzina V.P., Demidova G.V., Sokolova E.P., Bessalova I.A., Borodina T.N., Alekseeva L.P. et al. [Comparison of the protein spectrum of lipopolysaccharide preparations from *Yersinia pestis* grown at 28 and 37 °C]. Biotekhnologia. 2003; 3:20–4.

4. Kostyukova N.N., Pereverzev N.A. [Adhesion in *Corynebacterium diphtheriae*]. Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol. 1985; 11:30–2.

5. Kostyukova N.N. [Early stage of infectious process – colonization and the way of its termination]. Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol. 1989; 9:103–10.

6. Makarenkova I.D., Kompanets G.G., Zaporozhets T.S. [Inhibition of pathogenic microorganisms adhesion on eukaryotic cells]. Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol. 2006; 3:121–5.

7. Oborin V.A., Ivonin A.G., Pimenov E.V., Romanov V.E., Abasheva

F.I., Vylegzhanina O.V. [Studying of adhesion of *Yersinia pestis* vaccinal strain EV cells to human erythrocytes by photocolorimetric method]. Vestnik Novosib. Gos. Univer. Ser.: Biol., Klin. Med. 2009; 7(3):25–9.

8. Romanov V.E., Ivonin A.G., Bondarenko A.L., Oborin V.A., Nekhoroshkina E.L. [The way of estimating bacteria-fixing activity of erythrocytes]. RF Patent № 2360969.

9. Serebryakova E.V., Darmov I.V., Medvedev N.P., Alekseev S.A., Rybak S.I. [Evaluation of the hydrophobicity of bacterial cells by measuring their adherence to chloroform drops]. Mikrobiologia. 2002; 71(2):237–9.

10. Fedorovich V.V., Kalyuzhny S.V., Van-der-Miren P., Verstrast V. [Development of a phenomenological model of bacterial adsorption to low energy surfaces]. Vestnik MSU. Ser. 2. Khimia. 2002; 43(6):417–20.

11. Yaskovich G.A., Yakovleva E.P. [Strain-specific variations in the hydrophobicity of the bacterial cell surface]. Mikrobiologia. 1996; 65(4):565–71.

#### Authors:

Pimenov E.V., Ivonin A.G. The Laboratory of Comparative Cardiology of the Komi Science Centre of the RAMS Ural Division (Kommunisticheskaya St., 24, Syktyvkar, 167982, Russia), Vyatka State Agricultural Academy (Oktyabr'sky Pr., 133, Kirov, 610017, Russia).

Oborin V.A. Vyatka State University. Krasnoarmeiskaya St., 26, Kirov, 610002, Russia. E-mail: vaoborin50@mail.ru

#### Об авторах:

Пименов Е.В., Ивоин А.Г. Лаборатория сравнительной кардиологии Коми научного центра Уральского отделения Российской академии наук (167982, Сыктывкар, ул. Коммунистическая, 24). Вятская государственная сельскохозяйственная академия (610017, Киров, Октябрьский пр-т, 133).

Оборин В.А. Вятский государственный гуманитарный университет. 610002, Киров, ул. Красноармейская, 26. E-mail: vaoborin50@mail.ru

Поступила 15.11.12.