

**В. А. Оборин¹, А. Г. Ивонин², Е. В. Пименов¹,
В. Е. Романов², Ф. И. Абашева¹, О. В. Вылегжанина¹**

¹ Вятский государственный университет
ул. Московская, 36, Киров, 610017, Россия

² Вятская государственная сельскохозяйственная академия
Октябрьский просп., 133, Киров, 610017, Россия
E-mail: vaoborin50@mail.ru

ИЗУЧЕНИЕ АДГЕЗИИ КЛЕТОК ВАКЦИННОГО ШТАММА *EV YERSINIA PESTIS* К ЭРИТРОЦИТАМ ЧЕЛОВЕКА ФОТОКОЛОРИМЕТРИЧЕСКИМ МЕТОДОМ

Целью проводимых исследований явился выбор оптимальных условий для изучения адгезии клеток вакцинного штамма *EV Y. pestis* к эритроцитам человека фотокolorиметрическим методом. Оценку степени прикрепления бактерий к эритроцитам после их совместной инкубации и последующего осаждения эритроцитов центрифугированием проводили, используя показатель бактериофиксирующей активности эритроцитов (БФАЭ). Выбран оптимальный режим центрифугирования проб, изучено влияние условий инкубации бактерий и эритроцитов на величину БФАЭ. Установлена зависимость показателя степени адгезии от концентрации эритроцитов.

Ключевые слова: адгезия, бактерии, эритроциты, бактериофиксирующая активность эритроцитов.

Для патогенных микроорганизмов необходимой предпосылкой проявления их вирулентных свойств и начала развития инфекционного процесса является адгезия, т. е. прикрепление к поверхности клеток хозяина.

В настоящее время изучение адгезивных свойств бактерий занимает важное место в микробиологических исследованиях. За два последних десятилетия получен довольно обширный материал по механизмам адгезии. Установлено, что данный процесс осуществляется посредством молекулярных механизмов, включающих лиганд-рецепторное взаимодействие, при этом в роли лигандов выступают различные элементы, находящиеся на наружной поверхности бактерий, а рецепторами являются специфические образования, расположенные на внешней оболочке клеток хозяина [1–4].

При оценке адгезивных свойств бактерий в качестве клеток макроорганизма исследователи обычно используют эпителиальные клетки [5–7] или эритроциты человека [8–10] и различных видов животных. Эритроциты имеют на своей поверхности гликофорин – вещество идентичное гликока-

лику эпителиальных клеток, на котором расположены рецепторы для адгезинов микробов, и поэтому они считаются универсальной моделью для изучения адгезии различных микроорганизмов [11]. Однако большинство из имеющихся методов определения адгезивности бактерий трудно воспроизводимы в практических условиях или недостаточно информативны.

Наиболее доступная методика изучения адгезии предложена В. И. Брилис и соавт. [12]. Смесь бактерий и эритроцитов инкубируют при температуре 37 °С в течение 30 мин с периодическим встряхиванием. Затем на предметных стеклах готовят мазки и рассматривают под световым микроскопом. Адгезивные свойства оценивают с помощью среднего показателя адгезии (СПА), количества микробных клеток, прикрепившихся к одному эритроциту при подсчете 50–100 эритроцитов.

На наш взгляд, этот метод не лишен определенных недостатков, к которым можно отнести относительную субъективность и значительную трудоемкость при подсчете микробных клеток на поверхности эритроцитов. Кроме того, его значительно

обесценивает ограниченное количество исследуемых эритроцитов.

Учитывая изложенное, на модели «клетки вакцинного штамма *EV Yersinia pestis* – эритроциты человека» нами разработан простой, но в то же время достаточно объективный и информативный метод изучения адгезии бактерий [13]. Метод основан на фотоколориметрической регистрации прикрепления микробных клеток к поверхности эритроцитов после их совместной инкубации и последующего осаждения эритроцитов центрифугированием. Для оценки степени адгезии нами введен показатель бактериофиксирующей активности эритроцитов (БФАЭ).

Цель исследования: определить оптимальные условия для изучения адгезии клеток вакцинного штамма *EV Y. pestis* к эритроцитам человека фотоколориметрическим методом.

Материал и методы

Вакцинный штамм *EV Y. pestis* получен в ФГУ «48 ЦНИИ Минобороны РФ», эритроциты человека – в Кировском НИИ гематологии и переливания крови Росмедтехнологий.

Бактерии в виде 48-часовой культуры, выращенные при температуре 28 ± 2 °С на плотной питательной среде на основе гидролизата рыбной муки с добавлением генцианвиолета, суспендировали в 0,9 % растворе NaCl. Оптическую плотность (ОП) взвеси доводили до 1,0 усл. ед. при длине волны 540 нм. Для измерения ОП применяли фотоэлектроколориметр КФК-2 и кюветы с длиной оптического пути 5 мм.

Для соблюдения стандартных условий эксперимента использовали нативные эритроциты одного донора. Исследование было одобрено Этическим комитетом при Кировском НИИ гематологии и переливания крови Росмедтехнологий (протокол № 5 от 15.10.2008). У практически здорового донора из локтевой вены забирали кровь, стабилизируя ее 3,8 % раствором цитрата натрия (1 : 10). В тот же день эритроциты трижды отмывали 0,9 % раствором NaCl путем центрифугирования при 1 000 об./мин в течение 2 мин при 20 °С, а затем готовили их

взвесь в концентрациях 0,05, 0,1, 0,25, 0,5 и $1,0 \times 10^{12}$ /л в этом же растворе.

В силиконизированные пробирки помещали по 1,0 мл взвеси эритроцитов и по 2,5 мл взвеси бактерий, в качестве контроля применяли пробы с 1,0 мл 0,9 % раствора NaCl и 2,5 мл взвеси бактерий (контрольная система № 1), а также с 1,0 мл взвеси эритроцитов и 2,5 мл 0,9 % раствора NaCl (контрольная система № 2).

Пробирки инкубировали на вращающейся платформе при 37 °С в течение 30 мин, после чего центрифугировали при 1 000 об./мин для осаждения эритроцитов. Затем из пробирок отбирали надосадочную жидкость в количестве 2,0 мл и на КФК-2 определяли ее ОП.

Показатель БФАЭ рассчитывали по формуле:

$$\text{БФАЭ} = (D_{\text{к1}} - D_{\text{оп}} + D_{\text{к2}}) / D_{\text{к1}} \times 100 \%,$$

где $D_{\text{оп}}$ – ОП надосадочной жидкости в опытной системе («эритроциты + бактерии»); $D_{\text{к1}}$ – ОП надосадочной жидкости

в контрольной системе № 1; $D_{\text{к2}}$ – ОП надосадочной жидкости в контрольной системе № 2.

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 исследования и обсуждение

При проведении исследований важно было подобрать такую продолжительность центрифугирования проб, при которой соблюдались следующие требования: во-первых, происходило практически полное осаждение эритроцитов, во-вторых, не наблюдалось значительного оседания бактерий под действием сил их собственной тяжести.

Для этого пробы с 2,5 мл взвеси бактерий и 1,0 мл 0,9 % раствора NaCl и пробы с 1,0 мл взвеси эритроцитов концентрацией $1,0 \times 10^{12}$ /л и 2,5 мл 0,9 % раствора NaCl центрифугировали в течение различного времени при заданной скорости, а затем измеряли величину ОП надосадочной жидко-

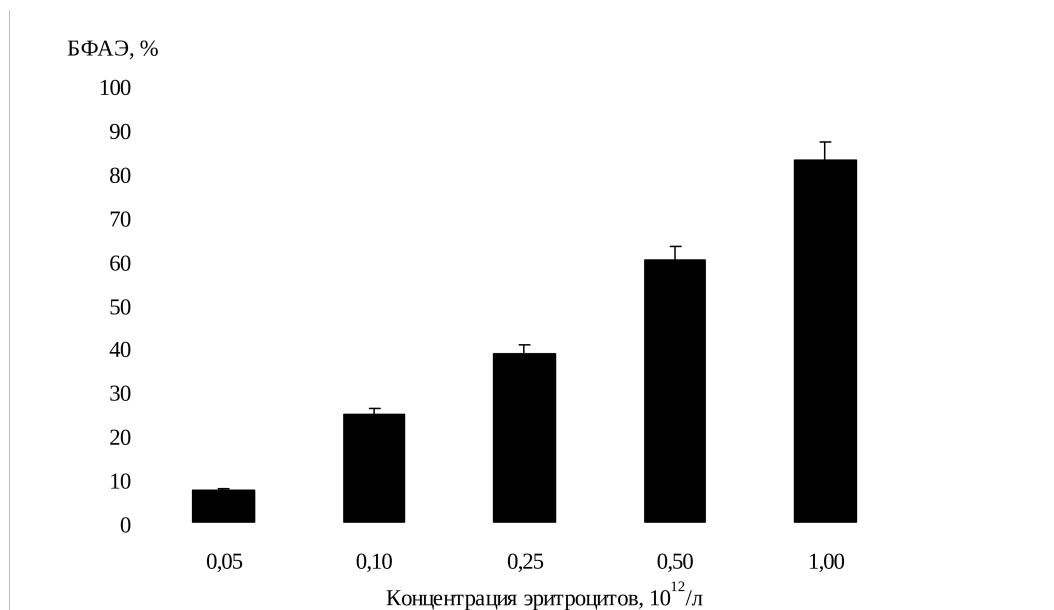


Рис. 1. Показатель БФАЭ в отношении вакцинного штамма *EV Y. pestis* при использовании различных концентраций эритроцитов

Влияние продолжительности центрифугирования на величину ОП надосадочной жидкости проб, усл. ед. ($M \pm m$)

Состав проб	ОП надосадочной жидкости после центрифугирования проб		
	1,0 мин	1,5 мин	2,0 мин
1,0 мл взвеси эритроцитов и 2,5 мл 0,9 % раствора NaCl	0,324 ± 0,006	0,060 ± 0,004	0,034 ± 0,002
2,5 мл взвеси бактерий и 1,0 мл 0,9 % раствора NaCl	0,522 ± 0,004	0,492 ± 0,004	0,298 ± 0,006

сти в них; результаты эксперимента представлены в табл.

Надосадочная жидкость проб с эритроцитами после центрифугирования в течение 1,5 и 2,0 мин практически не содержала эритроцитов, об этом свидетельствовали низкие значения ОП в этих пробах, составившие $0,060 \pm 0,004$ и $0,034 \pm 0,002$ усл. ед. соответственно. После осаждения в течение 1,0 мин эритроциты еще оставались в надосадочной жидкости, ее ОП при этом была значительно выше и составляла $0,324 \pm 0,006$ усл. ед.

Значительное снижение ОП надосадочной жидкости проб с бактериями после центрифугирования в течение 2 мин по сравнению с аналогичными показателями, определенными после 1,0 и 1,5 мин вращения, свидетельствовало о существенном осаждении бактериальных клеток за данное время.

Следовательно, указанным выше требованиям соответствовал лишь режим центрифугирования проб в течение 1,5 мин.

Далее была изучена зависимость показателя БФАЭ от концентрации эритроцитов. Для этого смешивали взвеси эритроцитов различных концентраций со стандартной взвесью микробных клеток, после чего определяли степень адгезии (рис. 1).

На основании полученных данных можно утверждать, что между количеством эритроцитов в пробах и величиной БФАЭ существует прямая связь. Наибольшее значение БФАЭ зарегистрировано при исходной концентрации эритроцитов $1,0 \times 10^{12}/л$, поэтому именно ее стали использовать в дальнейших исследованиях.

На следующем этапе оценили влияние различных условий инкубации эритроцитов и бактерий на величину БФАЭ (рис. 2).

При анализе данных оказалось, что прикрепление клеток вакцинного штамма *EV Y. pestis* к эритроцитам человека происходит

ло в течение первых пяти минут инкубации проб, причем в большей части сразу же после смешивания эритроцитов и бактерий. Так, показатель БФАЭ, определяемый непо-

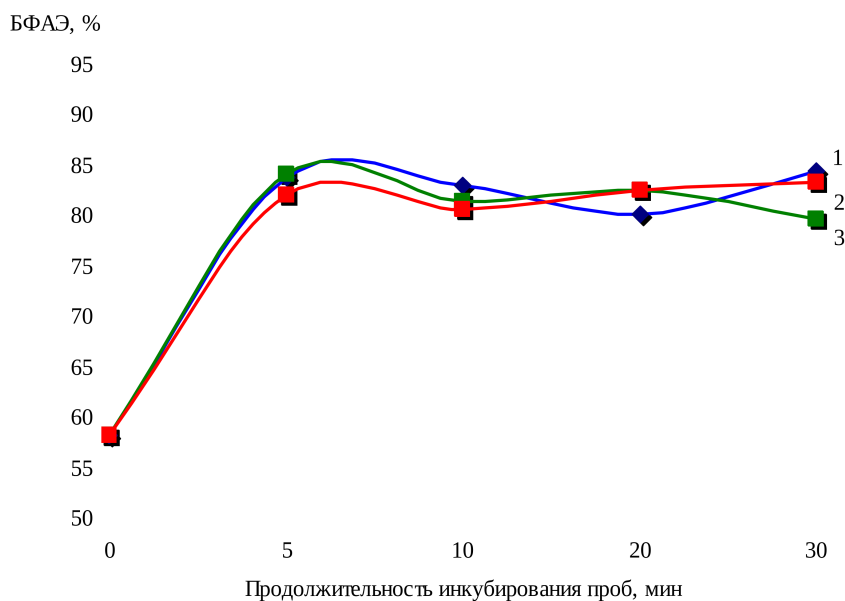


Рис. 2. Изменение показателя БФАЭ в отношении вакцинного штамма *EV Y. pestis* при различной продолжительности инкубации проб:
 1 – в статических условиях при 20 °С; 2 – в динамических условиях при 37 °С;
 3 – в статических условиях при 37 °С

средственно после смешивания эритроцитов и бактериальных клеток, составил около 60 %. После пяти минут инкубации проб во всех применяемых условиях данный показатель повысился до 80–85 %, последующее же увеличение продолжительности инкубации не приводило к изменению БФАЭ. Таким образом, мы пришли к выводу, что при изучении взаимодействия клеток вакцинного штамма *EV Y. pestis* с эритроцитами человека фотоколориметрическим методом достаточно выдерживать пробы при 20 °С в статических условиях в течение 5 мин.

Следует отметить, что представленные данные являются начальными в исследовании адгезии вакцинного штамма *EV Y. pestis*. Выяснение условий и факторов, влияющих на величину показателя БФАЭ, не только представляет теоретический интерес, но и имеет большое практическое значение для последующей работы по изысканию возможных ингибиторов адгезии.

Заключение

В результате проведенного исследования были выбраны оптимальные условия для изучения адгезии клеток вакцинного штамма *EV Y. pestis* к эритроцитам человека

фотоколориметрическим методом. Характеристика этих условий была следующей: а) использование взвеси эритроцитов концентрацией $1,0 \times 10^{12}/л$ в 0,9 % растворе NaCl; б) выдерживание проб с эритроцитами и бактериями в статических условиях при 20 °С в течение 5 мин; в) центрифугирование проб при 1 000 об./мин в течение 1,5 мин.

Список литературы

1. Езепчук Ю. В. Патогенность как функция биомолекул. М., 1985.
2. Еропкина Е. М., Афиногенов Г. Е. Антиадгезивная активность белковых комплексов биологических жидкостей и секретов // Журн. микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. 1994. № 2. С. 110–116.
3. Костюкова Н. Н. Начальный этап инфекционного процесса – колонизация и пути ее предотвращения // Журн. микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. 1989. № 9. С. 103–110.
4. Roth J. A. Virulence mechanisms of bacterial pathogens. Washington, 1988.
5. Кушнарёва М. В. Влияние нитилмицина, амикацина, цефтазидима и цефатаксима на адгезивные свойства микроорганизмов, выделенных у новорожденных

детей // Антибиотики и химиотерапия. 2000. № 7. С. 17–21.

6. Burnett T. A., Dinkia K., Rohde M., Chhatwal G. S., Uphoff C., Srivastava M., Cordwell S. J., Geary S., Liao X., Minion F. C., Walker M. J., Jordejevich S. P. P 159 is a proteolytically processed, surface adhesion of *Mycoplasma hiopneumoniae*: Defined domains of P 159 bind heparin and promote adherence to eukaryote cells // Mol. Microbiol. 2006. Vol. 60, № 3. P. 669–686.

7. Zhang M. J., Meng F. L., Ji X. I., He L. H., Zhang J. Z. Adherence and invasion of mouse adapted *H. pylori* in different epithelial cell lined // World J. Gastroenterol. 2007. Vol. 13, № 6. P. 845–850.

8. Зайцева Е. А., Сомов Г. П. Влияние температуры на адгезивные свойства листерий // Журн. микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. 2006. № 3. С. 20–23.

9. Макаренкова И. Д., Компанец Г. Г., Запорожец Т. С. Ингибирование адгезии патогенных микроорганизмов на эукариотических клетках // Журн. микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. 2006. № 3. С. 121–125.

10. Терехов В. И. Адгезивные и антибиотические свойства *Pseudomonas aeruginosa* / Ветеринария. 1995. № 6. С. 33–34.

11. Телесманич Н. Р., Ломов Ю. Н., Бардых И. Х., Винокур Н. И. Адгезивные и некоторые другие свойства *Vibrio cholerae* ТСР+ СТХ-, изолированных на объектах внешней среды Ростовской области в 2002 году // Журн. микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. 2004. № 6. С. 3–6.

12. Брилис В. И., Брилене Т. А., Ленцнер Х. П., Ленцнер А. А. Методика изучения адгезивного процесса микроорганизмов // Лаб. дело. 1986. № 4. С. 210–212.

13. Ивонин А. Г., Романов В. Е., Оборин В. А., Нехорошкина Е. Л. Фотометрический метод определения бактериофиксирующей активности эритроцитов // Достижения ветеринарной науки и практики: Сб. ст. всерос. науч.-практ. конф. Киров, 2008. С. 63–69.

Материал поступил в редколлегию 24.12.2008

V. A. Oborin, A. G. Ivonin, E. V. Pimenov,
V. E. Romanov, F. I. Abasheva, O. V. Vylegzhanina

Studying of Adhesion of Vaccinal Strain *EV Yersinia Pestis* Cells to Human Erythrocytes by Photocolorimetric Method

The purpose of spent researches was choice of optimum conditions for studying adhesion of cells of vaccinal strain *EV Y. pestis* to human erythrocytes by a photocolorimetric method. An estimation of a degree of an attachment of bacteria to erythrocytes after their joint incubation and the subsequent sedimentation of erythrocytes by centrifugation carried out, using the bacteria-fixing activity of erythrocytes (BFAE) index. The optimum mode of centrifugation of tests is chosen, influence of conditions of incubation of bacteria and erythrocytes on size BFAE index is investigated. Dependence of an exponent of adhesion on concentration of erythrocytes is established.

Keywords: adhesion, bacteria, erythrocytes, a bacteria-fixing activity of erythrocytes.