

УДК 579.843.1:579.61:577.112

РОЛЬ АНТИЛАКТОФЕРРИНОВОЙ АКТИВНОСТИ В АДГЕЗИИ ХОЛЕРНЫХ ВИБРИОНОВ

Коршенко В.А., Черепяхина И.Я., Якушева О.А., Алексеева Л.П.

ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора», Ростов-на-Дону,
e-mail: OSV.RPCI@yandex.ru

При изучении механизма антилактоферриновой активности и ее роли в адгезии холерных вибрионов разработана методика определения ее уровня на культуре клеток аденокарциномы двенадцатиперстной кишки человека HuTu 80. Введены условные значения уровней адгезии. Показано, что при изучении уровня адгезии у различных биоваров и серогрупп холерных вибрионов наибольший показатель был у штаммов *V. cholerae* classical. Проведено сравнительное исследование адгезивной и антилактоферриновой активностей холерных вибрионов различной эпидемической значимости. Установлено наличие выраженной коррелятивной связи между этими признаками, что указывает на их роль как в патогенезе холеры, так и в персистенции возбудителя в организме человека. Показано, что эта связь обусловлена, с одной стороны, наличием маннозочувствительных пилей адгезии, с другой – инактивирующим влиянием гемагглютининов/протеазы холерных вибрионов на лактоферрин.

Ключевые слова: адгезивная активность, культура клеток HuTu 80, антилактоферриновая активность

ROLE OF ANTI-LACTOFERRIN ACTIVITY IN THE ADHESION OF VIBRIO CHOLERAЕ

Korshenko V.A., Cherepakhina I.Y., Yakusheva O.A., Alekseeva L.P.

The Rostov-on-Don Anti-Plague Institute of the Federal Agency for Consumer Rights Protection & Human Welfare Supervision of RF, Rostov-on-Don, e-mail: OSV.RPCI@yandex.ru

While studying the anti-lactoferrin activity and its role in the adhesion of *V. cholerae* a new method was proposed for determination of activity level on cell culture of human duodenum carcinoma cells HuTu 80. Conventional values of adhesion levels were introduced. The study of adhesion level of *V. cholerae* of different biovars and serovars showed the highest value for *V. cholerae* classical. A comparative study was carried out of the adhesive and anti-lactoferrin activity of *V. cholerae* strains of different epidemic significance. Marked correlation was found between these properties indicating their role in pathogenesis of cholera and pathogen persistence in human body. It was shown that this correlation was due, on the one hand, to the presence of mannose-sensitive pili of adhesion and, on the other hand, to inactivating effect of *V. cholerae* hemagglutinin-protease on lactoferrin.

Keywords: adhesive activity, cell culture HuTu 80, anti-lactoferrin activity

Как показали проведенные нами исследования, большинство изученных штаммов холерных вибрионов в той или иной степени обладают антилактоферриновой активностью (АЛФА), т.е. могут инактивировать белок лактоферрин [4]. Известно, что одной из функций лактоферрина является препятствие микробной адгезии и колонизации на энтероцитах кишечника человека [7, 8]. Предстояло решить вопрос – какова в этой связи роль антилактоферриновой активности в реализации холерным вибрионом одного из важнейших свойств патогенности и персистенции – адгезивной активности, т.е. выяснение роли АЛФА в патогенезе холеры и в персистенции возбудителя в организме человека.

Цель исследования: сравнить уровни адгезивной и антилактоферриновой активностей холерных вибрионов различных серогрупп и биоваров, и определить наличие или отсутствие коррелятивной связи между уровнями адгезии и АЛФА.

Материалы и методы исследования

В работе по оценке адгезивной активности использовали 20 штаммов холерных вибрионов 01 се-

рогруппы классического и Эль Тор биоваров и вибрионы 0139 серогруппы.

Для решения поставленных задач была взята культура клеток HuTu 80 (аденокарцинома двенадцатиперстной кишки человека). Культуры холерных вибрионов готовили непосредственно перед опытом. Для этого штаммы выращивали на агаре Мартена (pH 7,6–7,8) в течение 18 часов, затем засеивали одну стандартную петлю ($d = 2$ мм) исследуемой культуры в бульон LB (pH 7,6–7,8), выдерживали в термостате при 37°C в течение 3 часов. Все культуры с помощью денситаметра (ErbalChema) доводили до концентрации 10^8 м.к./мл. В 1 мл среды DMEM с 5% эмбриональной бычьей сыворотки добавляли по 10 мкл стандартизированной взвеси, для получения конечной концентрации вибрионов 10^6 м.к./мл и вносили в пенфлаконы с дисками (диски 12,0 X 0,11 SPL Lifesciences), на которых сформирован разреженный монослой HuTu 80. Инкубировали в течение 90 минут при 37°C в CO₂ инкубаторе (Nuage), затем удаляли питательную среду и промывали разреженный монослой дважды раствором Хенкса pH 7,4 от несвязавшихся с монослоем клеток холерных вибрионов, фиксировали 5% формалином 1 час для соблюдения требований биологической безопасности, высушивали и окрашивали диски по Романовскому – Гимза 1:5 в течение 35–40 минут. Окрашенные диски три раза промывали раствором Хенкса pH 7,4 доставали из флаконов, высушивали, просматривали под свето-

вым микроскопом фирмы Nikon (увеличение 100×10). Просмотр дисков начинали с контроля. Адгезивные свойства определяли по числу вибрионов, связавшихся со 100 клетками NuTu 80, и рассчитывали индекс адгезии по формуле:

$$ИА = \frac{\Sigma КБ}{100К},$$

где ИА – индекс адгезии;

ΣКБ – количество клеток бактерий, прикрепившихся к 100 клеткам линии NuTu 80;

100К – 100 клеток линии NuTu 80.

Оценка индекса адгезии: > 20 – высокоадгезивный штамм; от 10 до 20 – среднеадгезивный штамм; < 10 – низкоадгезивный штамм.

Результаты исследования и их обсуждение

Результаты определения уровня адгезии исследуемых штаммов на культуре клеток NuTu 80, представлены в табл. 1. В группе классических холерных вибрионов показатели варьировались от $16,64 \pm 3,9$ до $26,42 \pm 6,4$ (среднее значение в группе $21,14 \pm 4,2$), т.е. были достаточно высокими. У вибрионов, относящихся к O139 серогруппе, показатели на культуре клеток NuTu 80 были очень низкими, от $4,12 \pm 1,1$ до $5,11 \pm 1,6$ (средний показатель $4,7 \pm 1,2$). При этом показатели были невысокими, независимо от групп штаммов (выделенных от больных и из воды открытых водо-

емов), примерно одинаковыми и составляли $4,6 \pm 1,2$ и $4,88 \pm 1,3$ соответственно. Причиной столь низкой активности у вибрионов O139 серогруппы может служить мощная капсула, маскирующая адгезивные рецепторы на поверхности клеток.

В группе Эль Тор вибрионов, выделенных из разных источников, показатели на клеточной модели NuTu 80 колебались от среднего до высокого ($10,17 \pm 4,3$ – $24,46 \pm 5,8$). Уровень адгезии у штаммов, выделенных от больных и носителей, был достаточно высоким ($18,34 \pm 3,2$ и $18,61 \pm 5,2$ соответственно), у штаммов, выделенных из воды открытых водоемов, – более низким ($10,57 \pm 3,6$). Средний показатель в группе составил $16,34 \pm 2,8$.

При ранжировании штаммов вибрионов Эль Тор по эпидемической опасности (наличие генов токсинопродукции – стх токсинорегулируемых пилей адгезии – tcp) результаты выглядели следующим образом (рис. 1). Наибольшим показателем обладали потенциально эпидемически опасные штаммы холерных вибрионов с генотипом ctx^+tcp^+ ($22,39 \pm 3,4$) (рис. 2). Как видно, для данной группы штаммов адгезия играет важную роль для обеспечения в отсутствие токсинопродукции условий для сохранения популяции холерных вибрионов в кишечнике человека (вибриононосительство).

Таблица 1

Показатели уровня адгезии у штаммов холерных вибрионов на культуре клеток NuTu 80

Штаммы		Наличие генов	Источник выделения	Показатели индекса адгезии		Среднее значение ИА
V. cholerae classical	437	ctx ⁺ tcp ⁺	Больные	26,42 ± 6,4		21,14 ± 4,2
	1077			22,61 ± 4,9		
	971			16,64 ± 3,9		
	792			20,15 ± 2,6		
	1601			19,86 ± 3,2		
V. cholerae 0139	16065	ctx ⁺ tcp ⁺	Больные	4,12 ± 1,1	4,6 ± 1,2	4,7 ± 1,2
	17258			5,11 ± 1,6		
	18772	ctx ⁻ tcp ⁻	Вода открытых водоемов	5,03 ± 1,6	4,88 ± 1,3	
	18925			4,73 ± 1,5		
V. choleraeEl Tor	18374	ctx ⁺ tcp ⁺	Больные	16,02 ± 4,9	18,34 ± 3,2	16,34 ± 2,8
	17471			15,09 ± 3,8		
	18775			23,91 ± 5,4		
	17427	ctx ⁺ tcp ⁺	Носители	17,03 ± 4,03	18,61 ± 5,2	
	18257	ctx ⁻ tcp ⁺		20,36 ± 4,02		
	18821			20,83 ± 3,7		
	18781			24,46 ± 5,8		
	18750	ctx ⁻ tcp ⁻				
	18774	ctx ⁻ tcp ⁻	Вода открытых водоемов	8,03 ± 3,2		
	17899			13,51 ± 6,2		
	18777			10,17 ± 4,3		

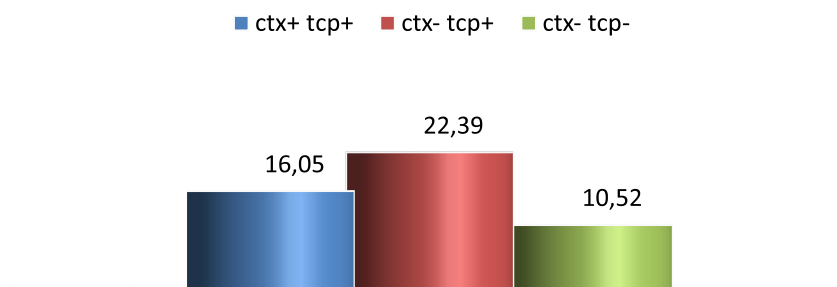


Рис. 1. Показатели уровня адгезии у штаммов Эль Тор на культуре клеток НuTi 80, ранжированных по эпидемической опасности

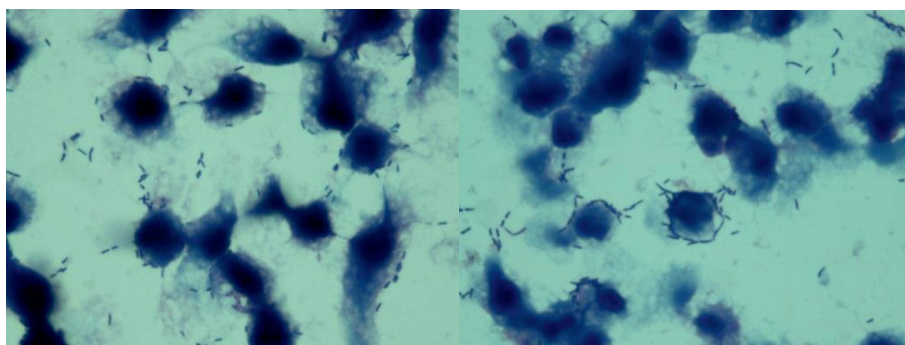


Рис. 2. Адгезия на культуре клеток НuTi 80 потенциально эпидемически опасных вибрионов Эль Тор

Для эпидемически опасных штаммов с генотипом ctx^+tcp^+ были характерны средние значения ($16,05 \pm 2,2$). Поскольку для этой группы штаммов основной показатель – токсинопродукция, обуславливающая клинику холеры, показатели адгезии могут быть не очень высокими. Наименьшим показателем обладали авирулентные штаммы вибрионов Эль Тор с генотипом ctx^-tcp^- ($10,52 \pm 4,1$), они не продуцируют основные факторы патогенности и не персистируют в организме человека.

По полученным результатам был проведен сравнительный коррелятивный анализ между уровнем АЛФА и показателями индексов адгезии исследуемых штаммов с определением коэффициента корреляции (КК) между ними (табл. 2). Статистическую обработку результатов проводили с использованием компьютерной программы Microsoft Excel 8.0 по критериям линейной регрессии и корреляции. При сравнительном анализе полученных значений обращает на себя внимание отсутствие коррелятивной связи между уровнями АЛФА и адгезии у холерных вибрионов O139 серогруппы (коэффициент корреляции отрицательный, $-0,6$). У классических холерных

вибрионов, обладающих высокой способностью к адгезии и низкими показателями антилактоферриновой активности, коэффициент корреляции был средним и составлял 0,76. Можно предположить, что невысокий удельный вес вибриононосительства при классической холере подтверждает вывод о низком персистентном потенциале таких вибрионов. Об этом же свидетельствует отсутствие у классических холерных вибрионов мобильных «островов персистенции» и «островов пандемичности», которые содержат гены, кодирующие продукцию факторов, обеспечивающих высокий уровень адаптации патогена к условиям окружающей среды [2, 5, 6].

Наиболее высоким был коэффициент корреляции адгезивной активности и АЛФА у вибрионов Эль Тор (0,82), при этом наиболее высок в группе потенциально эпидемически опасных штаммов ctx^+tcp^+ (0,99). Это свидетельствует о значимости этих признаков в персистенции возбудителя холеры, прошедшего в период седьмой пандемии холеры длительный путь эволюции в сторону повышения уровня адаптации для жизнедеятельности в различных экологических нишах.

Таблица 2

Определение коэффициентов корреляции между адгезивной и антилактоферриновой активностями у холерных вибрионов O1 и O139 серогрупп

Штаммы		Значения уровня адгезии	Значения уровня АЛФА нг/мл	Наличие генов	Коэффициент корреляции (КК)	
V. cholerae classical	437	26,42 ± 6,4	40	ctx ⁺ tcp ⁺	0,76	
	1077	22,61 ± 4,9	10			
	971	16,64 ± 3,9	0			
	792	20,15 ± 2,6	28			
	1601	19,86 ± 3,2	0			
V. cholerae 0139	16065	4,12 ± 1,1	56	ctx ⁺ tcp ⁺	– 0,6	
	17258	5,11 ± 1,6	24			
	18772	5,03 ± 1,6	55	ctx ⁺ tcp ⁻		
	18925	4,73 ± 1,5	57			
V. cholerae El Tor	17427	17,03 ± 4,03	100	ctx ⁺ tcp ⁺	0,82	0,88
	17471	15,09 ± 3,8	75			
	18374	16,02 ± 4,9	75			
	18775	23,91 ± 5,4	100	ctx ⁺ tcp ⁺		0,99
	18821	20,83 ± 3,7	94			
	18781	24,46 ± 5,8	100			
	18257	20,36 ± 4,02	93			
	18750	10,36 ± 3,9	78	ctx ⁺ tcp ⁻		0,67
	18774	8,03 ± 3,2	40			
	17899	13,51 ± 6,2	75			
	18777	10,17 ± 4,3	79			

Заключение

Проведенная работа позволила установить причину прямой коррелятивной связи между АЛФА и показателями адгезивной активности. Как известно, за адгезию и колонизацию холерных вибрионов в кишечнике человека отвечают токсинкорегулируемые пили адгезии, кодируемые генами tcpA. Кроме них известны и другие пили, в том числе, маннозочувствительные пили адгезии (MSHA), кодируемые генами mshA. В последние годы пили MSHA, считаются существенными факторами персистенции [1]. Учитывая вышеизложенное, можно предположить, что MSHA, наряду с токсинкорегулируемыми пили, принимают участие как в адгезии холерных вибрионов, так и в связывании лактоферрина. Ранее нами было показано [3], что антилактоферриновая активность резко снижается в присутствии маннозы, которая блокирует маннозочувствительные рецепторы на поверхности холерных вибрионов. В пользу этого предположения свидетельствует тот факт, что большинство изученных штаммов с генотипами ctx⁺tcp⁺ и ctx⁻tcp⁻ обладали генами mshA, кодирующими маннозочувствительные пили адгезии.

Несомненна и роль гемагглютинин/протеазы, расщепляющей лактоферрин и препятствующей тем самым адгезии этого белка на эпителиоцитах кишечника (ген harA обнаружен у всех взятых в опыт штаммов холерных вибрионов). Таким образом, можно констатировать, что выраженная коррелятивная связь антилактоферриновой и адгезивной активностей является подтверждением важности этих двух признаков в патогенезе холеры и персистенции холерных вибрионов Эль Тор в организме человека.

Список литературы

1. Балахонов С.В., Миронова Л.В., Куликалова Е.С., Урбанович Л.Я., Хунхеева Ж.Ю., Басов Е.А., Афанасьев М.В., Гольдапель Э.Г., Ганин В.С. Эпидемиологический надзор за холерой в Сибири и на Дальнем Востоке: результаты и направления совершенствования // Холера и патогенные для человека вибрионы: – Ростов н/Д, 2014. – Вып. 27. – С. 28–35.
2. Ерошенко Г.А., Щелканова Е.Ю. Генетическая характеристика некоторых штаммов *Vibrio cholerae* не O1/ не O139 серогруппы, выделенных от людей // Холера и патогенные для человека вибрионы: – Ростов н/Д, 2005. – Вып. 18. – С. 77–78.
3. Коршенко В.А., Черепяхина И.Я. Роль лектинов в механизме реализации антилактоферриновой активности холерных вибрионов // Прил. № 44 к Росс. Жур. гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии. Материалы Юбилейной Двадцатой Объединенной Российской Гастроэнтерологической недели. – М., 2014. – Т. XXIV. – № 5. – С. 100.

4. Подройкина В.А., Балахнова В.В., Телесманич Н.Р., Черепанина И.Я. Роль антилактоферриновой активности в персистенции холерных вибрионов // «ЗН и СО». – 2011. – № 6. – С. 46–48.
5. Топорков А.В., Кульшань Т.А., Лозовский Ю.В., Смирнова Н.И. Генетическая неоднородность популяции холерных вибрионов Эль Тор, выделенных на территории Астраханской области (1970–2002 годы) // Холера и патогенные для человека вибрионы: – Ростов н/Д, 2005. – Вып. 18. – С. 79–81.
6. Щелканова Е.Ю., Ерошенко Г.А., Смирнова Н.И. Вариабельность участка хромосомы, содержащего гены биосинтеза O139 антигена, у различных штаммов *Vibrio cholerae* O139 // Холера и патогенные для человека вибрионы: – Ростов н/Д, 2005. – Вып. 18. – С. 75–76.
7. Di Biase A.M., Tinari A., Pietrantonio A., Antonini G., Valenti P., Conte M.P. et al. Effect of bovine lactoferricin on enteropathogenic *Yersinia* adhesion and invasion in HEp-2 cells. *J. Med. Microbiol.* – 2004. – № 53. – P. 407–412.
8. WillerEda M., Lima Rde L. and Giugliano L.G. In vitro adhesion and invasion inhibition of *Shigella dysenteriae*, *Shigella flexneri* and *Shigella sonnei* clinical strains by human milk proteins. *BMC Microbiol.* – 2004. – № 4. – P. 18–25.
3. Korshenko V.A., Cherepahina I.Ja. Rol lektinov v mehanizme realizacii antilaktoferrinovoј aktivnosti holernyh vibriонов // Pril. no. 44 k Ross. Zhur.gastroenterologii, gepatologii, koloproktologii. Materialy Jubilejnoj Dvadcatoj Obedinenoј Rossijskoј Gastroenterologicheskој nedeli. M., 2014. T. XIV. no. 5. pp. 100.
4. Podrojkina V.A., Balahnova V.V., Telesmanich N.R., Cherepahina I.Ja. Rol antilaktoferrinovoј aktivnosti v persistencii holernyh vibriонов // «ZN i SO». 2011. no. 6. pp. 46–48.
5. Toporkov A.V., Kulshan T.A., Lozovskij Ju.V., Smirnova N.I. Geneticheskaja neodnorodnost populjacii holernyh vibriонов Jel Tor, vydelennyh na territorii Astrahanskoј oblasti (1970–2002 gody) // Holera i patogennye dlja cheloveka vibriony: Rostov n/D, 2005. Vyp. 18. pp. 79–81.
6. Shhelkanova E.Ju., Eroshenko G.A., Smirnova N.I. Variabelnost uchastka hromosomy, sodержashhego geny biosinteza O139 antigena, u razlichnyh shtammov *Vibrio cholerae* O139 // Holera i patogennye dlja cheloveka vibriony: Rostov n/D, 2005. Vyp. 18. pp. 75–76.
7. Di Biase A.M., Tinari A., Pietrantonio A., Antonini G., Valenti P., Conte M.P. et al. Effect of bovine lactoferricin on enteropathogenic *Yersinia* adhesion and invasion in HEp-2 cells. *J. Med. Microbiol.* 2004. no. 53. pp. 407–412.
8. WillerEda M., Lima Rde L. and Giugliano L.G. In vitro adhesion and invasion inhibition of *Shigella dysenteriae*, *Shigella flexneri* and *Shigella sonnei* clinical strains by human milk proteins. *BMC Microbiol.* 2004. no. 4. pp. 18–25.

References

Рецензенты:

Терентьев А.Н., д.м.н., с.н.с., ведущий научный сотрудник лаборатории диагностики ООИ, г. Ростов-на-Дону;

Кудрякова Т.А., д.м.н., с.н.с., ведущий научный сотрудник лаборатории бактериофагов ООИ, г. Ростов-на-Дону.