

УДК 612.111.32

## Модификация метода гемосканирования и перспективы его применения при изучении механизмов адгезии бактерий на эритроцитах

© 2011. В. А. Оборин<sup>1</sup>, к.м.н., доцент,  
Е. В. Пименов<sup>2</sup>, чл.-корр. РАН, д.м.н., г.н.с., А. Г. Ивонин<sup>2</sup>, к.б.н., н.с.,  
<sup>1</sup>Вятский государственный университет,  
<sup>2</sup>Лаборатория сравнительной кардиологии Коми НЦ УрО РАН,  
e-mail: vaoborin50@mail.ru

В статье приведены результаты исследований по модификации метода гемосканирования для визуализации процесса прикрепления микробных клеток к эритроцитам. Модифицированный метод прост в исполнении и достаточно информативен, для его проведения требуется минимальное количество образцов исследуемой крови. Предлагаемый метод может применяться при комплексном изучении механизмов адгезии бактерий на клетках макроорганизма.

This article results researches on updating of a method of haemoscanning. The modified method is simple performed by and is informative enough, for its carrying out the minimum quantity of samples of investigated blood is required. The offered method can be applied to visualization into process of an attachment of microbic cells to erythrocytes at complex studying into mechanisms of adhesion of bacteria on cells of macroorganism.

Ключевые слова: гемосканирование, адгезия, бактерии, эритроциты

Key words: adhesion, bacteria, haemoscanning, erythrocytes

Адгезия представляет собой универсальный многостадийный и многокомпонентный процесс, обеспечивающий колонизацию бактериями любых плотных субстратов, включая ткани человека и млекопитающих [1 – 3]. При воздействии неблагоприятных факторов окружающей среды на бактерии и на макроорганизм происходят изменения в характере адгезии микробных клеток к слизистым оболочкам и покровным тканям хозяина. Следовательно, по показателям адгезии бактерий к эукариотическим клеткам можно судить об экологическом состоянии среды обитания макро- и микроорганизмов. Поэтому в настоящее время большое внимание исследователей уделяется изучению механизмов прикрепления микробных клеток к клеткам макроорганизма как *in vitro*, так и *in vivo* [4 – 7]. Ввиду идентичности гликофорина эритроцитов и гликокаликса эпителиоцитов при изучении адгезивных свойств бактерий наиболее часто используются методы, в которых в качестве субстрата адгезии применяются эритроциты [8 – 11]. Авторами статьи разработан фотокolorиметрический метод определения бактериофиксирующей активности эритроцитов, хорошо зарекомендовавший себя при изучении адгезии микробных штаммов различного происхождения на эритроцитах млекопитающих [12, 13].

В то же время для визуализации процесса взаимодействия эритроцитов с бактериями необходимо было использовать микроскопию.

Анализ литературы свидетельствует о том, что в последние годы в клинической и лабораторной практике используются методы, основанные на современных технологиях, которые дают возможность в сжатые сроки устанавливать неблагоприятное воздействие различных факторов на организм. Одним из таких методов является гемосканирование – метод исследования крови, позволяющий оценивать функциональное состояние и структуру форменных и патологических элементов крови, а также её плазмы [14].

При гемосканировании капля капиллярной крови исследуется под большим увеличением светового микроскопа (1000-1500 раз). При этом изображение передаётся через видеокамеру на монитор и может сохраняться на электронных носителях. Данных об использовании гемосканирования для изучения механизмов адгезии бактерий на эритроцитах в доступной нам литературе не обнаружено.

Цель настоящей работы состояла в модификации метода гемосканирования для визуализации процесса адгезии бактерий на поверхности эритроцитов.

**Материалы и методы исследований**

В работе использовали вакцинный штамм *Yersinia pestis* EV НИИЭГ, полученный из ФГУ «48 ЦНИИ Минобороны РФ», пробиотический штамм *Lactobacillus casei* DN-114001, предоставленный ОАО «Агровет», а также музейный штамм *Staphylococcus epidermidis* из коллекции кафедры морфологии и микробиологии Вятской ГСХА.

Культивирование штамма *Y. pestis* осуществляли на агаризованном гидролизате рыбной муки (ГРМ-агаре pH 7,2) при температуре  $(28 \pm 1)^\circ\text{C}$  в течение 24 часов. Музейный штамм *S. epidermidis* выращивали на ГРМ-агаре (pH 7,2) при температуре  $37 \pm 1^\circ\text{C}$  в течение 24 часов. Для культивирования клеток *L. casei* DN-114001 применяли среду Мозера-Рогоза-Шарпа (MRS), выращивание осуществляли в анаэробных условиях при температуре  $37 \pm 1^\circ\text{C}$  в течение 24 часов. Выращенные микробные культуры суспензировали в стерильном 0,9% растворе хлорида натрия (pH 7,2).

Для получения суспензии эритроцитов использовали венозную кровь человека 0(I) Rh+ группы крови. В качестве антикоагулянта применяли 3,8% раствор цитрата натрия (1:10). Не позднее 24 ч после взятия крови эритроциты трижды отмывали десятикратным объёмом 0,9% раствора хлорида натрия путём центрифугирования при 1000 об./мин в течение 5 мин и ресуспензировали в этом же растворе.

Микроскопию объектов проводили, пользуясь световым микроскопом «Миктрон-400М» (ООО «Петролазер», г. С.-Петербург), оснащённым цифровой видеокамерой.

Для витального (прижизненного) окрашивания микробных клеток в суспензию бактерий добавляли малоядовитые красители (метиленовый синий, нейтральный красный, конго красный) в соотношении 1:1000. После этого микробную суспензию инкубировали при  $37 \pm 1^\circ\text{C}$  в течение 30 минут.

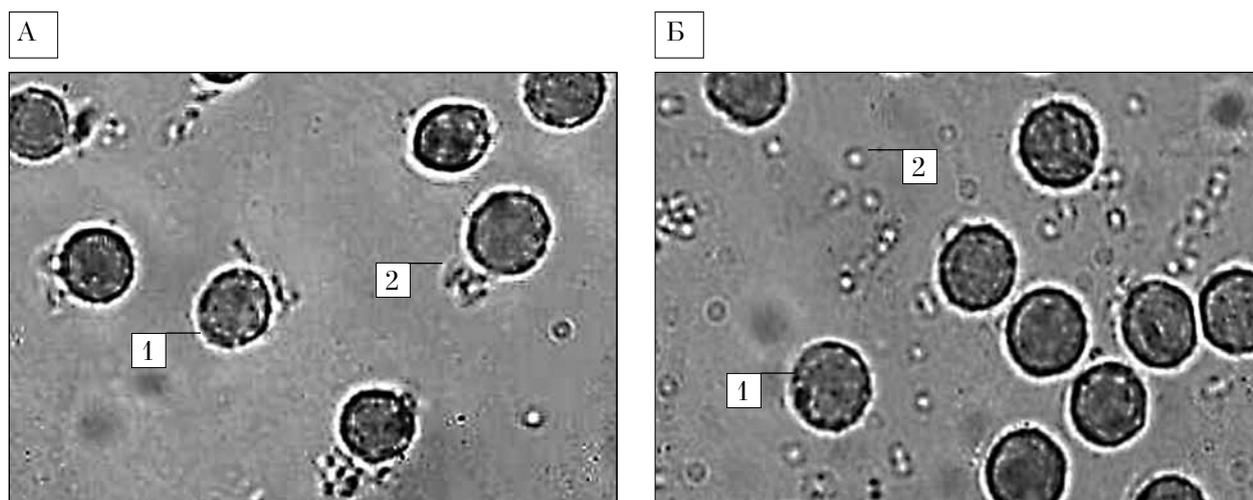
При оценке адгезии фотоколориметрическим методом [12] вычисляли показатель адгезии (ПА). Статистическую обработку полученных результатов проводили при помощи компьютерной программы «Biostat» версии 4.03.

**Результаты и их обсуждение**

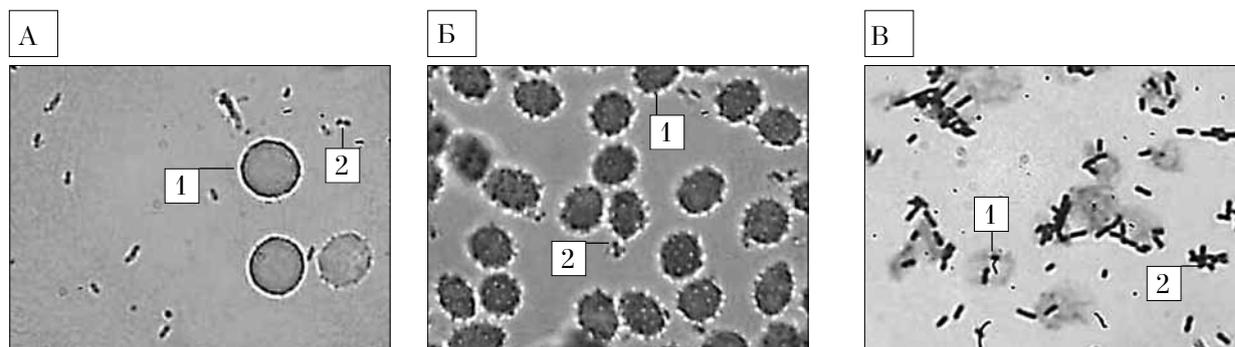
Предлагаемая нами модификация метода гемосканирования заключалась в том, что в каплю крови или суспензию эритроцитов человека вносили исследуемую микробную культуру и готовили микроскопический препарат «раздавленная капля», который изучали под световым микроскопом (ув.  $\times 1000$ ), оценивая адгезию бактерий к красным кровяным клеткам.

При проведении экспериментов на предметном стекле смешивали по 1 капле суспензии эритроцитов в концентрации  $0,1 \times 10^{12}$  клеток/л и суспензии бактерий в концентрации  $1,0 \times 10^{12}$  клеток/л. Препараты накрывали покровным стеклом, выдерживали при температуре  $37 \pm 1^\circ\text{C}$  в течение 30 мин и подвергали световой микроскопии.

В поле зрения наблюдали бактерии *Y. pestis*, прикрепившиеся к эритроцитам (рис. 1 А). В то же время клетки *S. epidermidis* (рис. 1 Б) находились в межэритроцитарном пространстве и не фиксировались на поверхности эритроцитов.



**Рис. 1.** Микроскопическая картина при гемосканировании суспензии, содержащей эритроциты человека с клетками *Y. pestis* EV НИИЭГ (А) и *S. epidermidis* (Б).  $\times 1000$ . 1 – эритроциты; 2 – микробные клетки



**Рис. 2.** Микроскопическая картина при гемосканировании суспензии, содержащей эритроциты человека и окрашенные метиленовым синим бактерии *Y. pestis* EV НИИЭГ (А), *S. epidermidis* (Б) и *L. casei* DN-114001 (В).  $\times 1000$ . 1 – эритроциты; 2 – микробные клетки

Для лучшей визуализации процесса связывания эритроцитами бактерий последние предварительно окрашивали. При выборе красителя соблюдали два условия: во-первых, чтобы микробы хорошо были видны при микроскопировании, а во-вторых, чтобы испытуемый краситель не влиял на процесс прикрепления бактерий к эритроцитам. Из трёх испытанных красителей (метиленовый синий, нейтраль-рот, конго красный) наилучшие показатели в данном отношении проявил метиленовый синий. Микробные клетки *Y. pestis*, *S. epidermidis* и *L. casei*, обработанные данным красителем, были чётко видны в ходе микроскопирования (рис. 2). Бактерии *Y. pestis* и *L. casei* проявляли выраженную способность прикрепляться к эритроцитам человека.

Данные световой микроскопии были подтверждены нами при оценке адгезии с помощью фотоколориметрического метода (табл.). Для культур *Y. pestis* EV НИИЭГ и *L. casei* DN-114001 были характерны достаточно высокие значения ПА. В то же время музейный штамм *S. epidermidis* практически не проявил адгезивной активности.

С помощью модифицированного метода гемосканирования удалось выявить ряд закономерностей взаимодействия эритроцитов с изучаемыми штаммами бактерий. Клетки *S. epidermidis* практически не фиксировались к эритроцитам, в то же время бактерии *Y. pestis* и *L. casei* обладали высокой адгезивной актив-

ностью в отношении эритроцитов. Кроме того, при микроскопии проб с бактериями *Y. pestis* было обнаружено, что, как только микробная клетка фиксируется на эритроците, она становится неподвижной. Если фиксированной микробной клетки касается другая бактерия, она прикрепляется к ней и также теряет подвижность. В результате данного процесса на некоторых эритроцитах формировались конгломераты из 5-10 бактерий.

Преимущество модифицированного метода гемосканирования перед другими методами оценки адгезии микроорганизмов бактериальной природы на модели эритроцитов заключается в том, что для его использования необходимы минимальные объёмы крови, которые можно получить из капилляра пальца человека или из хвостовой вены экспериментальных животных. В отличие от традиционных методик исследования адгезивного процесса [8], при использовании которых готовятся фиксированные микропрепараты, метод гемосканирования позволяет оценивать взаимодействие эритроцитов с микробными клетками «в живую», а результаты исследований сохраняются на электронных носителях и анализируются в дальнейшей работе. Модифицированный метод гемосканирования использовали для визуализации процесса фиксации бактерий на эритроцитах после оценки их взаимодействия с помощью фотоколориметрии, а также в ходе скрининговых исследований адгезии микроорганизмов бактериальной природы, находящихся как в вегетативном, так и в споровом состоянии, к эритроцитам млекопитающих [13].

### Заключение

Таким образом, для визуализации процесса адгезии бактерий на эритроцитах нами осуществлена модификация метода гемоска-

**Таблица**

Результаты оценки уровня адгезии бактерий на эритроцитах человека фотоколориметрическим методом ( $M \pm m$ ;  $n=5$ )

Микробная культура	Показатель адгезии, %
<i>Y. pestis</i> EV НИИЭГ	77,41 $\pm$ 5,29
<i>L. casei</i> DN-114001	55,25 $\pm$ 4,17
<i>S. epidermidis</i>	2,61 $\pm$ 1,46

нирования, которая заключается в следующем. В каплю крови или суспензию эритроцитов вносят изучаемые микробные клетки, после инкубации проб при  $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$  в течение 30 мин готовят микропрепарат «раздавленная капля» и осуществляют его микроскопию в иммерсионной системе микроскопа (ув.  $\times 1000$ ), оценивая уровень адгезии бактерий к красным кровяным клеткам. Для лучшей визуализации процесса адгезии применяют витальную окраску микробных клеток метиленовым синим. Метод прост в исполнении, не требует больших объемов крови и может использоваться как самостоятельно, так и наряду с другими методами в комплексном исследовании механизмов адгезии бактерий на эритроцитах. При этом возможность оценки взаимодействия микроорганизмов с эритроцитами, находящимися непосредственно в крови, приближает условия эксперимента к условиям *in vivo*.

### Литература

1. Donlan R.M., Costerton J.W. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms // Clin. Microbiol. Rev. 2002. V. 15. № 2. P. 167–193.
2. Богданова Е.А., Несвижский Ю.В., Воробьев А.А. Адгезивные свойства лактобактерий и эшерихий в различных отделах желудочно-кишечного тракта человека в норме и патологии // Вестник РАМН. 2006. № 1. С. 35–38.
3. Сидоренко С.В. Инфекционный процесс как «диалог» между хозяином и паразитом // Клинический микробиологический химиотерапевтический журнал. 2001. Т. 3. № 4. С. 301–315.
4. Колякина А.В. Лектиновые рецепторы холерных вибрионов: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. Ставрополь. 2009. 18 с.
5. Телесманич Н.Р., Ломов Ю.М., Бардых И.Х., Винокур Н.И. Адгезивные и некоторые другие свойства *Vibrio cholerae* TSP<sup>+</sup> СТХ<sup>-</sup>, изолированных на объектах внешней среды Ростовской области в 2002 году // Журнал микробиологии. 2004. № 6. С. 3–6.
6. Saldana Z., Erdem A.L., Schüller S., Okeke I.N., Lucas M., Sivananthan A., Phillips A.D., Kaper J.B., Puentepelto J.L., Giron J.A. The *Escherichia coli* common pilus and the bundle-forming pilus act in concert during the formation of localized adherence by Enteropathogenic *E. coli* // J. Bact. 2009. V. 191. № 11. P. 3451–3461.
7. Ананьева Н.В., Ганина В.И., Ленченко Е.М., Ванина Н.Н. Оценка методов исследования взаимодействия бактерий с клетками животных // Доклады Российской академии сельскохозяйственных наук. 2007. № 3. С. 53–55.
8. Брилис В.И., Брилене Т.А., Ленцнер Х.П., Ленцнер А.А. Методика изучения адгезивного процесса микроорганизмов // Лабораторное дело. 1986. № 4. С. 210–212.
9. Гизатулина С.С., Биргер М.О., Кулинич Л.И., Фиш Н.Г., Мазитова О.П., Бирюкова Н.В. Способ оценки состояния микрофлоры кишечника человека по количеству адгезивно-активных колоний и типу адгезинов // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. 1991. № 4. С. 21–23.
10. Зайцева Е.А., Сомов Г.П. Влияние температуры на адгезивные свойства листерий // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. 2006. № 3. С. 20–23.
11. Смолина Т.П., Черных С.В., Горшкова Р.П. Снижение адгезии микроорганизмов на клетках уроэпителия с помощью полисахарида, выделенного из морских протеобактерий *Pseudoalteromonas nigrifaciens* // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. 2006. № 3. С. 58–61.
12. Романов В.Е., Ивонин А.Г., Бондаренко А.Л., Оборин В.А., Нехорошкина Е.Л. Способ определения бактериофиксирующей активности эритроцитов. Патент РФ на изобретение № 2360969; опубл. 10.07.2009. Бюл. № 11.
13. Оборин В.А. Бактериофиксирующая активность эритроцитов. Киров: Вятская ГСХА, 2010. 194 с.
14. Грейндж К. Темнопольный микроскоп и его возможности в клинической практике / [http://vitash.narod.ru/gemoscan\\_greindg1.htm](http://vitash.narod.ru/gemoscan_greindg1.htm)

*Работа выполнена в рамках программы Президиума РАН «Фундаментальные науки – медицине» на 2011 год. Авторы выражают благодарность Президиуму РАН за возможность проведения данных исследований.*