2
НОМЕР

ISSN 2304-9081
Электронный журнал
On-line версия журнала на сайте
http://www.elmag.uran.ru

БОНЦ

БЮЛЛЕТЕНЬ
ОРЕНБУРГСКОГО НАУЧНОГО ЦЕНТРА УрО РАН

2016

УЧРЕДИТЕЛИ
УРАЛЬСКОЕ ОТДЕЛЕНИЕ РАН
ОРЕНБУРГСКИЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР УрО РАН

© И.В. Гладышева, С.В. Черкасов, 2016

УДК 579.61

И.В. Гладышева, С.В. Черкасов

ХАРАКТЕРИСТИКА АДГЕЗИИ ВАГИНАЛЬНЫХ КОРИНЕБАКТЕРИЙ К ФИБРОНЕКТИНУ

Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза УрО РАН, Оренбург, Россия

Цель. Исследовать адгезию вагинальных коринебактерий к фибронектину, а также изучить влияние на адгезию биотических и абиотических факторов.

Материалы и методы. В исследовании использованы микроорганизмы рода *Corynebacterium*, выделенные из нижнего отдела репродуктивного тракта женщин. Адгезивную способность коринебактерий изучали на полистироловых планшетах к фиксированному фибронектину. Оценивали изменение адгезии коринебактерий к фибронектину после инкубирования последних в цитратно-фосфатном буфере при различных значениях pH, а также после обработки ультрафиолетовым облучением, температурой, трипсином, маннозой и хлорамфениколом.

Результаты. Показано, что вагинальные штаммы коринебактерий обладают способностью адгезии к фибронектину. Выраженность процесса адгезии зависит от значения pH и достигает наиболее высоких показателей при низких значениях этого фактора. Воздействие температуры, ультрафиолетового облучения, маннозы, трипсина и хлорамфеникола вызывает снижение адгезивной способности у 100% штаммов независимо от микроэкологического состояния биотопа, из которого они были выделены.

Заключение. Подавление адгезии у коринебактерий протеазами (в частности трипсином), хлорамфениколом (ингибитором синтеза белка) и углеводами (маннозой), вероятно, свидетельствует о том, что у исследуемых штаммов медиаторами адгезии выступают адгезины белковой и углеводной природы, возможно лектины, что предполагает наличие адгезии коринебактерий к различным структурам на поверхности вагинального эпителия и характеризует коринебактерии как высокоадгезивные микроорганизмы. Вероятно, благодаря наличию такого рода адгезинов, коринебактерии способны прикрепляться не только к фибронектину, но и к специфическим рецепторам клеток вагинального эпителия, тем самым конкурируя за сайты адгезии с другими микроорганизмами. Полученные данные, фактически, открывают новый взгляд на роль коринебактерий в формировании вагинального микробиоценоза и являются аргументом в пользу их участия в реализации колонизационной резистентности.

Ключевые слова: Corynebacterium spp., фибронектин, адгезия, вагинальный микробиоценоз.

I. V. Gladysheva, S. V. Cherkasov

CHARACTERISTICS OF ADHESION VAGINAL CORYNEBACTERIUM TO FIBRONECTIN

Institute of Cellular and Intracellular Symbiosis UrB RAS, Orenburg, Russia

Objective. To investigate the adhesion of corynebacteria to vaginal fibronectin, as well as to study the effect on adhesion of biotic and abiotic factors.

Materials and methods. The study used microorganisms of the genus *Corynebacterium* isolated from the lower reproductive tract of women. Adhesive capacity corynebacteria studied on polystyrene plates fixed to fibronectin. Evaluated change adhesion to vaginal epitheliocytes corynebacteria after of the latter in citrate-phosphate buffer at different pH values and also after

the treatment of ultraviolet irradiation, temperature, trypsin, mannose and chloramphenicol.

Results. All the strains possessed the ability to bind fibronectin. The most favorable pH for the adhesion process was pH = 3, the smallest capacity for adhesion was observed at pH = 6. Reducing the adhesion of the studied strains to fibronectin under the influence of temperature, ultraviolet irradiation, trypsin and chloramphenicol and mannose demonstrate the role of protein and mannose-dependent structures, which can bind not only with fibronectin, but with carbohydrates

Conclusion. We can suppose that in tested strains adhesion mediators are adhesins by protein nature or possibly lectins, that assumes corynebacteria adhesion to various structures, for example, carbohydrates on the surface of vaginal epithelium and characterizes Corynebacteria as highly adhesive microorganisms. It appears that by virtue of such type adhesins presence, Corynebacteria are capable to attach not only to fibronectin, but also to specific receptors of vaginal epithelial cells, thereby competing for adhesion sites with other microorganisms. The received data actually gives a new perspective on the role of *Corynebacterium* in the formation of the vaginal microbiocenosis.

Keywords: Corynebacterium spp, fibronectin, adhesion, vaginal microbiocenosis, colonization resistance

Введение

Организм человека с присущей ему микробиотой представляет собой единую экологическую систему. Микроорганизмы различных биотопов, вступая в сложные симбиотические ассоциации, оказывают весомое влияние на функционирование различных органов и систем. Не является исключением и репродуктивный тракт женщин, где основная роль в поддержании гомеостаза принадлежит доминирующим микроорганизмам – лактобациллам [1]. Наряду с лактобациллами во влагалище чаще всего обнаруживаются и непатогенные коринебактерии [2]. Данные бактерии способны выживать и персистировать в биотопе, несмотря на развитие дисбиотических состояний и антибиотикотерапию [3, 4]. Известно, что основой для колонизации биотопа микроорганизмами является их способность прикрепляться к эпителиальным клеткам-мишеням и белкам межклеточного матрикса, в частности к фибронектину[5, 6]. Специфичность такого рода адгезии позволяет представителям резидентной микрофлоры, в частности лактобактериям, конкурировать за сайты адгезии на эпителиоцитах кишечника и влагалища с патогенными микроорганизмами и, тем самым, играть ключевую роль в реализации колонизационной резистентности [7]. В то же время для условно-патогенных и патогенных микроорганизмов этот факт будет иметь важное значение в развитии инфекции [8, 9].

По-видимому, адгезия к фибронектину является важной и для коринебактерий, поскольку наличие данного свойства у исследуемых микроорга-

низмов, вероятно, может определять их сохранение в условиях как нормо-, так и патоценоза.

Учитывая вышеизложенное, целью настоящей работы явилось изучение особенностей адгезии коринебактерий к фибронектину.

Материалы и методы

В работе использовано 16 штаммов *Corynebacterium* spp., выделенных из репродуктивного тракта здоровых женщин (первая группа) и женщин с микроэкологическими нарушениями (вторая группа). Из них *C. minutissimum* (n=5), *C. amycolatum* (n=3), *C. group JK* (n=2), *C. bovis* (n=2) , *C. afermentas* (n=1), *C. vitarumen* (n=1), *C. striatum* (n=1), *C. renale* (n=1).

Для получения чистых культур коринебактерий, производили взятие материала из заднего свода влагалища и аспирацию слизи цервикального канала. Посев материала осуществляли на чашки со средой Columbia (HiMedia Laboratories Pvt. Limited, India). Посевы инкубировали при температуре 37°С в течение 48 часов. Идентификацию микроорганизмов проводили общепринятыми методами на основании морфологических, тинкториальных, культуральных и биохимических свойств [10].

Изучение адгезии коринебактерий к фибронектину проводили по известной методике [11].

Для изучения влияния pH на адгезивную способность коринебактерий к фибронектину, бактериальные клетки инкубировали в цитратно-фосфатном буфере при различных значениях pH 3, 4,5, 6 и далее определяли их адгезивную способность к фибронектину по описанной выше методике.

Для изучения влияния температуры на адгезию к фибронектину, термоинактивированные бактерии получали нагреванием взвеси отмытой центрифугированием (3000 об/мин, 15 минут) в 0,9% растворе NaCl суточной культуры бактерий до 100°С в течение 2 минут. В качестве контроля использовали те же штаммы, не обработанные температурой.

Для определения влияния ультрафиолетового облучения на адгезию к фибронектину штаммы коринебактерий, выращенные на плотной питательной среде, обрабатывали в течение 10 минут под ультрафиолетовой лампой. Расстояние между лампой и поверхностью культуры составило 10 см, мощность лампы 1800w/см³. Затем культуры трижды отмывали центрифугированием (3000 об/мин, 15 мин) в 0,9% растворе NaCl. Готовили взвесь бактери-

альных клеток 10^9 КОЕ/мл на цитратно-фосфатном буфере pH 4,5 и определяли адгезивную способность по описанной ранее методике. В качестве контроля использовали штаммы коринебактерий не обработанные ультрафиолетовым облучением.

Для изучения влияния трипсина и маннозы на адгезию микроорганизмов к фибронектину готовили рабочий раствор трипсина (Sigma) 5 мкг/мл в 0,1 М фосфатном буфере и 1% раствор маннозы (Sigma) в цитратно-фосфатном буфере pH 4,5. К 1 мл бактериальной взвеси 10^9 КОЕ/мл добавляли 1 мл трипсина или маннозы и инкубировали при температуре 37°С 60 минут. В качестве контроля использовали бактериальную взвесь и цитратно-фосфатный буфер pH 4,5 в соотношении 1:1.

Для изучения влияния хлорамфеникола на адгезию микроорганизмов к фибронектину готовили рабочий раствор антибиотика с градиентом концентраций (750, 500, 250, 125 50, 25 и 10 мкг/мл). При этом 300 мкл антибиотика в различных концентрациях вносили в 2,7 мл МПБ. Затем бактериальную взвесь коринебактерий с оптической плотностью, соответствующей стандарту мутности 0,5 по McFarland, в объеме 100 мкл помещали в бульон с антибиотиком. После инкубирования в течение 24 часов при температуре 37°С проводили учет полученных результатов. Наличие роста микроорганизма в бульоне (помутнение бульона) свидетельствовало о том, что данная концентрация антибиотика недостаточна, чтобы подавить его жизнеспособность. Первая наименьшая концентрация антибиотика (из серии последовательных разведений), где визуально не определялся бактериальный рост, считалась минимальной подавляющей концентрацией (МПК). В эксперименте использовали наибольшую концентрацию антибиотика, при которой еще наблюдался рост микроорганизмов – субингбирующая концентрация.

Результаты экспериментов, проведенных трижды в независимых сериях, статистически обрабатывались согласно рекомендациям [12].

Результаты и обсуждение

Экспериментально выявлено, что фибронектинсвязывающей способностью обладали все штаммы коринебактерий, выделенные от здоровых женщин, и 66,7% штаммов, выделенных от женщин с микроэкологическими нарушениями. При этом коэффициент адгезии (Ia) у штаммов, выделенных у здоровых женщин, в среднем составил 19,6%, тогда как у штаммов, выделен-

ных у женщин с микроэкологическими нарушениями – 8,9% (рис. 1).

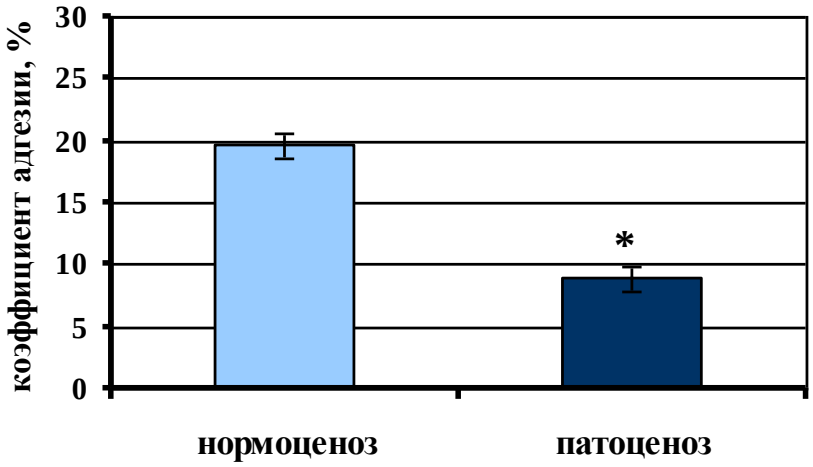

Рис. 1. Адгезия *Corynebacterium* spp. к фибронектину в зависимости от микроэкологического состояния биотопа.

*Примечание: * – различия статистически значимы при сравнении с данным показателем у штаммов, выделенных у здоровых женщин (p≤0,05).*

Наиболее выраженной способностью к адгезии обладали штаммы *C. minutissimum, C. amycolatum,* выделенные у здоровых женщин, их Ia составил 38,3 и 30,6 % соответственно. Минимальной адгезивной способностью обладал штамм *C. afermentas*, выделенный при микроэкологических нарушениях (Ia=5,7%).

Выраженность процесса адгезии у штаммов, выделенных как от здоровых женщин, так и от женщин с микроэкологическими нарушениями прямопропорционально зависела от значения pH (рис. 2).

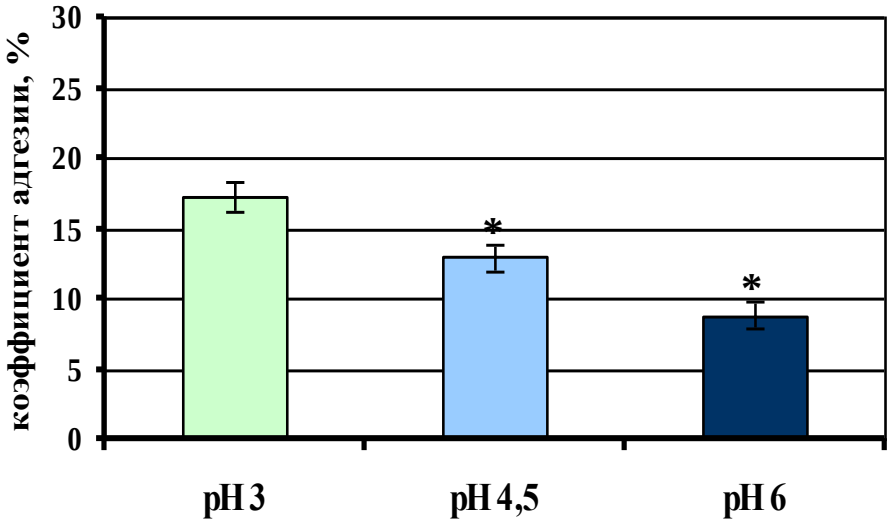

Рис. 2. Адгезия коринебактерий к фибронектину в зависимости от pH среды.

*Примечание: * – различия статистически значимы при сравнении с pH=3 (p≤0,05). По оси абсцисс: значение pH среды.*

Наиболее благоприятное значение pH для процесса адгезии составило pH=3, наименьшая способность к адгезии проявляли исследуемые штаммы при pH=6. Учитывая полученные, данные все последующие эксперименты выполнялись при pH=4,5.

Воздействие температуры, ультрафиолетового облучения, маннозы, трипсина и хлорамфеникола вызывало снижение адгезивной способности у 100% штаммов, выделенных как у здоровых женщин, так и женщин с микроэкологическими нарушениями.

Так, под влиянием разных абиотических факторов (высокая температура, ультрафиолетовое облучение) адгезивная способность к фибронектину у штаммов, выделенных у здоровых женщин, снижалась на 24,5±2,9% и на 17,9±1,3%, у штаммов, выделенных у женщин с микроэкологическими нарушениями на 21,6±2,0 и 23,7±1,3% соответственно (табл. 1).

Таблица 1. Влияние биотических и абиотических факторов на адгезию микроорганизмов *Corynebacterium spp*. к фибронектину человека

Фактор	Процент подавления адгезии (%)	
	Corynebacterium spp. (первая группа)	*Corynebacterium* spp. (вторая группа)
Манноза 1% (1мг/мл)	12,2±0,7*	20,4±6,1*
Трипсин (5 мг/мл)	30,5±4,6 *	28,1±4,8*
Хлорамфеникол	23,1±1,7*	18,3±1,5*
Температура (2 мин. при 100ºС)	24,5±2,9*	21,6±2,0*
УФО (1800w/см³)	17,9±1,3*	23,7±1,3*

*Примечание: * – различия статистически значимы при сравнении с контролем ($p \leq 0,05$); за 100% учитывали адгезию штаммов без влияния фактора.*

Под влиянием биотических факторов (трипсин, манноза и хлорамфеникол) адгезивная способность коринебактерий к фибронектину также снижалась. У штаммов, выделенных у здоровых женщин, коэффициент адгезии уменьшался на 30,5±4,6, 12,2±0,7 и 23,1±1,7% соответственно при действии трипсина, маннозы, хлорамфеникола; у штаммов, выделенных у женщин с микроэкологическими нарушениями, на 28,1±4,8, 20,4±6,1 и 18,3±1,5% (табл. 1).

Заключение

Таким образом, в результате проведенных исследований было установлено, что адгезивная способность к фибронектину у коринебактерий зависит от микроэкологического состояния вагинального биотопа. Коэффициент адгезии к фибронектину у коринебактерий, выделенных от здоровых женщин, был достоверно выше по сравнению со штаммами, выделенными от женщин с микроэкологическими нарушениями.

Кроме того, выраженность процесса адгезии зависела от значения pH и достигала наиболее высоких показателей при низких значениях этого параметра. Увеличение способности связывания фибронектина у непатогенных штаммов коринебактерий при низких значениях pH может играть роль в поддержании колонизационной резистентности вагинального биотопа. Похожие данные получены другими авторами при изучении адгезии вагинальных лактобактерий к фибронектину [13]. Важно, что коринебактерии, как и лактобациллы, благодаря продукции органических кислот, сами поддерживают низкий уровень pH [14].

Снижение адгезии исследуемых штаммов к фибронектину под влиянием температуры, ультрафиолетового облучения, трипсина, хлормфеникола и маннозы свидетельствует о роли белковых и маннозо-зависимых структур, которые могут связываться не только с фибронектином, но и с углеводами.

Учитывая обнаруженное подавление адгезии у коринебактерий протеазами (в частности трипсином) и углеводами (маннозой), можно сделать предположение о том, что у исследуемых штаммов медиаторами адгезии выступают адгезины белковой природы, возможно лектины, что предполагает наличие адгезии коринебактерий к различным структурам на поверхности вагинального эпителия и характеризует коринебактерии как высокоадгезивные микроорганизмы.

Полученные результаты подтверждают данные других исследователей. Romeo-Steiner S. et al. (1999) изучили адгезивную способность коринебактерий *C. pseudotuberculosis, C. group F-1, C. group JK, C. minutissimum, C. group G-2, C. xerosis*, выделенных из подмышечной ямки здоровых пациентов, к буккальным эпителиоцитам, а также к дифференцированным и недифференцированным кератиноцитам и влияние на адгезивную способность коринебактерий маннозы, галактозы, N-ацетил-D-глюкозамина и фибронектина.

Оказалось, что вышеперечисленные соединения существенно снижали адгезивную способность исследуемых штаммов как к буккальным эпителиоцитам, так и кератиноцитам. Способность коринебактерий связывать маннозу, галактозу, N-ацетил -D-глюкозамин и фибронектин доказывает наличие различных рецепторов и адгезинов на поверхности этих бактериальных клеток [15]. Вероятно, благодаря наличию такого рода адгезинов, коринебактерии способны прикрепляться не только к фибронектину, но и к специфическим рецепторам клеток вагинального эпителия, тем самым, конкурируя за сайты адгезии с другими микроорганизмами.

Учитывая, что адгезия коринебактерий к фибронектину после воздействия на них высокой температуры, ультрафиолетового облучения, трипсина, хлорамфеникола и маннозы полностью не исчезала, можно предположить наличие у них структур небелковой природы, устойчивых к данным факторам и определяющих адгезивную способность этих бактерий.

Фибронектин, повышая колонизационный потенциал коринебактерий, позволяет конкурировать исследуемым бактериям за сайты адгезии с аллохтонными микроорганизмами, что, фактически, является аргументом в пользу их участия в реализации колонизационной резистентности хозяина.

ЛИТЕРАТУРА

1. Шендеров Б.А. Медицинская микробная экология и функциональное питание. Том 1: Микрофлора человека и животных и ее функции. М.: ГРАНТЬ, 1998. 208 с.
2. Бухарин О.В., Лобакова Е.С., Немцева Н.В. Ассоциативный симбиоз. Екатеринбург: УрО РАН, 2007. 264 с.
3. Шаталова А.Ю. Вульвовагинаты, вызванные условно-патогенными микроорганизмами, у пациенток репродуктивного возраста: этиология, клиника, диагностика и терапия: Автореф. дисс. канд. мед. наук. Москва, 2011.
4. Черкасов С.В., Гладышева И.В. Антибиотикорезистентность коринеформных бактерий репродуктивного тракта женщин. Антибиотики и химиотерапия. 2010. Т. 9–10: 45–49.
5. Ocaña V., Nader-Macías M.E. Adhesion of Lactobacillus vaginal strains with probiotic properties to vaginal epithelial cells. Biocell. 2001. 25(3): 265–273.
6. McMillan A., Macklaim J.M., Burton J.P. et al. Adhesion of Lactobacillus iners AB-1 to Human fibronectin: a key mediator for persistence in the vagina? Reprod. Sci. 2013. 20(7): 791–796.
7. Styriak I., Nemcova R., Chang Y.H. et al. Binding of extracellular matrix molecules by probiotic bacteria. Lett. Appl. Microbiol. 2003. 37: 329-333.
8. Murai M., Moriyama H., Hata E., Takeuchi F, Amemura-Maekawa J. Variation and association of fibronectin-binding protein genes fnbA and fnbB in Staphylococcus aureus Japanese isolates. Microbiol. Immunol. 2016. 17. doi: 10.1111/1348-0421.12377.
9. Somarajan S.R., La Rosa S.L., Singh K.V. et al. The fibronectin-binding protein Fnm contributes to adherence to extracellular matrix components and virulence of Enterococcus

faecium. Infect. Immun. 2015. 83(12): 4653-61. doi: 10.1128/IAI.00885-15.
10. Bernard K.A., Funke G. Genus *Corynebacterium*. In Whitman WB Bergey's manual of systematic bacteriology, vol 5. The actinobacteria. Springer. NY, 2012. 245–289.
11. Гладышева И.В., Черкасов С.В. Роль фибронектина в адгезии коринебактерий к вагинальным эпителиоцитам. Журн. микробиол. 2014. 6: 64-72.
12. Гланц С. Медико-биологическая статистика. М., Практика, 1998.
13. Nagy E., Froman G., Mardh P.A. Fibronectin binding of Lactobacillus species isolated from women with and without bacterial vaginosis. J. Med. Microb. 1992. 37: 38–42.
14. Funke G.A., von Graevenitz, Clarridge III J.E., Bernard K.A. Clinical microbiology of coryneform bacteria – a review. Clin. Microbiol. 1997. 10: 125–159.
15. Romero-Steiner S., Witek T., Balish E. Adherence of skin bacteria to human epithelial cells. J. Clin. Microbiol. 1990. 1: 27–31.

Поступила 12.05.2016

(*Контактная информация:* **Гладышева Ирина Вячеславовна** – научный сотрудник лаборатории по изучению механизмов формирования микробиоценозов человека Института клеточного и внутриклеточного симбиоза УрО РАН; адрес: 460000 г. Оренбург, ул. Пионерская, 11, тел.: 8 (3532) 775412; e-mail: gladishevaiv@yandex.ru

Черкасов Сергей Викторович – д.м.н., профессор РАН, директор Института клеточного и внутриклеточного симбиоза УрО РАН; e-mail: cherkasovsv@yandex.ru)

ЛИТЕРАТУРА

1. Shenderov B. A. Medical microbial ecology and functional nutrition. Volume 1: the Microflora of humans and animals and its functions. M.: GRANT, 1998. 208.
2. Bukharin O.V., Lobakova E.S., Nemtseva N.V., Cherkasov S.V. Associative symbiosis.Yekaterinburg. 2007. 259p.
3. Shatalova A. Y. Vulvovaginitis, caused by opportunistic microorganisms in patients of reproductive age: an etiology, clinic, diagnostics and therapy: author. Diss. Cand. med. Sciences. Moscow, 2011.
4. Cherkasov S. V., Gladysheva I.V. Coryneform antibiotic resistance of bacteria in the reproductive tract of women. Antibiotics and chemotherapy. 2010. T. 9-10: 45-49..
5. Ocaña V., Nader-Macías M.E. Adhesion of Lactobacillus vaginal strains with probiotic properties to vaginal epithelial cells. Biocell. 2001. 25(3): 265–273.
6. McMillan A., Macklaim J.M., Burton J.P. et al. Adhesion of Lactobacillus iners AB-1 to Human fibronectin: a key mediator for persistence in the vagina? Reprod. Sci. 2013. 20(7): 791–796.
7. Styriak I., Nemcova R., Chang Y.H. et al. Binding of extracellular matrix molecules by probiotic bacteria. Lett. Appl. Microbiol. 2003. 37: 329-333.
8. Murai M., Moriyama H., Hata E., Takeuchi F, Amemura-Maekawa J.Variation and association of fibronectin-binding protein genes fnbA and fnbB in Staphylococcus aureus Japanese isolates. Microbiol. Immunol. 2016. 17. doi: 10.1111/1348-0421.12377.
9. Somarajan S.R., La Rosa S.L., Singh K.V. et al. The fibronectin-binding protein Fnm contributes to adherence to extracellular matrix components and virulence of Enterococcus faecium. Infect. Immun. 2015. 83(12): 4653-61. doi: 10.1128/IAI.00885-15.
10. Bernard K.A., Funke G. Genus *Corynebacterium*. In Whitman WB Bergey's manual of systematic bacteriology, vol 5. The actinobacteria. Springer. NY, 2012. 245–289.
11. Gladysheva I.V, Cherkasov S.V. The role of fibronectin in adhesion to Corynebacterium to vaginal epithelial cells. Zh. microbiology. 2014. 6: 64-72.
12. Glantz S. Biomedical Statistics. M., Practice, 1998.
13. Nagy E., Froman G., Mardh P.A. Fibronectin binding of Lactobacillus species isolated from

women with and without bacterial vaginosis. J. Med. Microb. 1992. 37: 38-42.
14. Funke G.A., von Graevenitz, Clarridge III J.E., Bernard K.A. Clinical microbiology of coryneform bacteria – a review. Clin. Microbiol. 1997, 10: 125-159.
15. Romero-Steiner S., Witek T., Balish E. Adherence of skin bacteria to human epithelial cells. J. Clin. Microbiol. 1990. 1: 27-31.

Образец ссылки на статью:

Гладышева И.В., Черкасов С.В. Характеристика адгезии вагинальных коринебактерий к фибронектину. Бюллетень Оренбургского научного центра УрО РАН. 2016. 2: 10с. [Электронный ресурс] (URL: http://elmag.uran.ru:9673/magazine/Numbers/2016-2/Articles/GIV-2016-2.pdf).