

На правах рукописи

КОРШЕНКО Виктория Александровна

**АНТИЛАКТОФЕРРИНОВАЯ АКТИВНОСТЬ
ХОЛЕРНЫХ ВИБРИОНОВ**

03.02.03 – микробиология

Автореферат диссертации
на соискание ученой степени кандидата биологических наук

Ростов-на-Дону

2016

Работа выполнена в Федеральном казенном учреждении здравоохранения «Ростовский-на-Дону ордена Трудового Красного Знамени научно-исследовательский противочумный институт» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека Российской Федерации

Научный руководитель:

доктор медицинских наук, Черепихина Ирина Яковлевна

Официальные оппоненты:

Афанасьев Станислав Степанович, Заслуженный деятель науки РФ, доктор медицинских наук, профессор, Федеральное бюджетное учреждение науки «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г. Н. Габричевского» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека Российской Федерации, заместитель директора по биотехнологии

Яговкин Эдуард Александрович, доктор медицинских наук, Федеральное бюджетное учреждение науки «Ростовский научно-исследовательский институт микробиологии и паразитологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека Российской Федерации, зам. директора по научно-производственной деятельности

Ведущая организация:

Федеральное казенное учреждение здравоохранения «Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека Российской Федерации

Защита состоится «08» апреля 2016 г. в 13 ч на заседании диссертационного совета Д 350.002.01 при Федеральном бюджетном учреждении науки «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека Российской Федерации по адресу: 142279, Московская обл., Серпуховский район, пос. Оболенск.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Автореферат разослан

Ученый секретарь диссертационного совета
кандидат биологических наук,

Фурсова Надежда Константиновна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Особенностью седьмой пандемии холеры является выраженная адаптивная изменчивость возбудителя в различных экологических нишах, приводящая как к генетическим перестройкам, так и к фенотипическим вариациям. Длительность последней пандемии свидетельствует о том, что в процессе эволюции холерный вибрион Эль Тор приобрел (помимо повышенной патогенности) ряд свойств, способствующих длительному выживанию (персистированию) не только в окружающей среде, но и в адаптивно меняющейся среде организма человека.

В последние годы продолжается широкое изучение так называемых «маркеров персистенции» - секретлируемых факторов бактерий, вызывающих деградацию системы защиты хозяина, обеспечивая им длительное переживание в его организме.

Рядом исследователей [Валышев А.В., Валышева И.В., 2006] было показано, что антилактоферриновая активность может рассматриваться как фактор персистенции у ряда патогенных и условно-патогенных микроорганизмов. В основе механизма действия данного фактора лежат процессы, направленные на инактивацию лактоферрина. Используя так называемую «антилактоферриновую активность» - АЛФА, бактерии тем самым реализуют свой персистентный потенциал.

Исследования в области изучения антилактоферриновой активности немногочисленны. Роль антилактоферриновой активности в реализации персистентного потенциала у возбудителей особо опасных инфекций, в том числе холерных вибрионов, никем ранее не изучена. Вопросы, касающиеся роли АЛФА в патогенезе холеры (помимо борьбы за железо), участия этого маркера персистенции в адгезии и колонизации в

желудочно-кишечном тракте, выяснении диапазона активности данного признака в различных биотопах, установлении наличия или отсутствия корреляции АЛФА с другими признаками патогенности и персистенции, выяснении механизма действия антилактоферриновой активности остаются до настоящего времени малоизученными.

Цель исследования. Изучить антилактоферриновую активность холерных вибрионов O1 и O139 серогрупп, дать оценку роли этого фактора в патогенезе холеры и персистенции холерных вибрионов, сформулировать представление о механизме антилактоферриновой активности у возбудителя холеры.

Основные задачи исследования:

1. Адаптация методики изучения антилактоферриновой активности у условно-патогенных микроорганизмов для исследования штаммов холерных вибрионов.
2. Изучение *in vitro* и *in vivo* антилактоферриновой активности холерных вибрионов O1 и O139 серогрупп. Сравнение АЛФА холерных вибрионов, различающихся по источнику выделения и эпидемической значимости.
3. Определение наличия корреляционных связей между АЛФА и другими свойствами, обуславливающими персистенцию холерных вибрионов.
4. Изучение влияния различных углеводов на антилактоферриновую активность вибрионов.
5. Определение участия гемагглютинин/протеазы (НА/Р) холерных вибрионов в АЛФА.
6. Разработка метода определения уровня адгезии у холерных вибрионов на культуре клеток Нер-2 и NuTu 80. Определение наличия корреляционных связей между уровнем адгезии и АЛФА.

7. Изучение влияния различных видов стресса на антилактоферриновую активность.
8. Определение с помощью генетического анализа возможности участия других (кроме НА/Р) протеаз в антилактоферриновой активности холерных вибрионов О1 и О139 серогрупп.

Научная новизна и теоретическая значимость.

Впервые показано наличие антилактоферриновой активности у холерных вибрионов различных биоваров и серогрупп. Выявлены различия в уровнях АЛФА у *Vibrio cholerae El Tor*, *Vibrio cholerae 0139* и *Vibrio cholerae classical*. Наиболее высокие показатели отмечены в группе Эль Тор вибрионов, несколько ниже – у вибрионов О139 серогруппы, холерные вибрионы классического биовара в большинстве своем или не обладают АЛФА, или демонстрируют очень слабую активность.

При комплексной оценке антилактоферриновой активности у эпидемически значимых штаммов (*ctxAB⁺tcpA⁺*) вибрионов Эль Тор, выделенных от людей, зарегистрированы высокие показатели АЛФА, что косвенно указывает на роль антилактоферриновой активности в патогенезе холеры, возможно, в роли «малых факторов» патогенности.

Впервые показано, что потенциально эпидемически опасные вибрионы Эль Тор, с генотипом *ctxAB⁺tcpA⁺* обладают максимально выраженной способностью к продукции антилактоферринового фактора, что свидетельствует о значительной роли этого признака в персистенции этой группы вибрионов.

Впервые установлено наличие прямой корреляционной связи АЛФА с признаками персистенции, характерными для холерных вибрионов Эль Тор, выделенных от людей (антикомплементарной активностью и билирезистентностью). С признаками персистенции, характерными для

вибрионов, изолированных из объектов окружающей среды (антилизоцимная и РНК-азная активности), корреляция практически отсутствовала или была слабой. Это доказывает, что антилактоферриновая активность может рассматриваться как новый признак в составе «персистентного потенциала» холерных вибрионов.

Получены новые сведения о механизме действия антилактоферриновой активности. Впервые доказано участие в механизме АЛФА углеводных лектиновых рецепторов, как связующего звена между лактоферрином и клетками холерного вибриона. Показано участие в процессе АЛФА гемагглютинин/протеазы.

Отработан метод оценки уровня адгезии холерных вибрионов на модели культур клеток аденакарциномы двенадцатиперстной кишки человека HuTu 80. Подобраны критерии оценки уровня адгезии штаммов холерных вибрионов. Материалы направлены в Федеральную службу по интеллектуальной собственности, патентам и товарным знакам для получения патента на изобретение. Справка о приоритете № 2014149782 от 9.12.2014 г.

Впервые на модели клеточной линии аденакарциномы двенадцатиперстной кишки человека HuTu 80 дана количественная оценка адгезивной активности холерных вибрионов и доказана ее прямая корреляционная связь с АЛФА.

С помощью анализа наличия генов протеаз у исследуемых штаммов холерных вибрионов было установлено, что основная роль в расщеплении лактоферрина принадлежит НА/Р.

Практическая значимость работы. В Государственной коллекции патогенных бактерий (ГКПБ) ФКУЗ Российский-научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора

депонирован авторский штамм *Vibrio cholerae P-18775* O1 серогруппы биовара Эль Тор, обладающий высокой антикомплементарной и антилактоферриновой активностью.

По материалам работы оформлен раздел в Методических рекомендациях «Методики создания условий стресса для холерных вибрионов при изучении персистентного потенциала возбудителя холеры», которые рассмотрены на заседании Ученого Совета ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора 04.12.2014г. протокол №12 от 04.12.2014г., утверждены директором института.

По материалам работы оформлен раздел в «Методических рекомендациях по изучению свойств, обуславливающих персистенцию холерных вибрионов», которые рассмотрены на заседании Ученого Совета ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора 20.11.2009г., протокол №10 от 20.11.2009г., утверждены директором института.

Результаты исследований по определению уровня адгезии используются в Ростовском Государственном Медицинском Университете на кафедре микробиологии при чтении лекций, проведении практических занятий (акт о внедрении от 7.10.2015г.). Модифицирована методика определения антилактоферриновой активности холерных вибрионов, которая согласована с комиссией по контролю соблюдения требований биологической безопасности (протокол №13 от 10 декабря 2014г.).

Основные положения, выносимые на защиту

1. Используемая методика анализа холерных вибрионов по антилактоферриновой активности позволяет количественно оценивать АЛФА у штаммов, различающихся по источнику выделения, эпидемической значимости, биовару и серогруппе.

2. Анализ антилактоферриновой активности холерных вибрионов дает возможность выявить наличие прямой корреляционной связи с факторами персистенции, присущими штаммам, выделенным от больных и вибрионосителей (антикомплементарной активностью и билирезистентностью), и отсутствие или наличие очень слабой связи, характерной для штаммов, персистирующих в воде открытых водоемов (антилизоцимной и РНК-азной активностью).

3. Сравнительная оценка антилактоферриновой активности холерных вибрионов позволяет отнести АЛФА к числу признаков, составляющих «персистентный потенциал» возбудителя холеры.

4. В механизме антилактоферриновой активности принимают участие углеводные лектиновые рецепторы как связующее лактоферрин звено и гемагглютинин/протеаза как фактор, расщепляющий этот белок.

5. Разработанный метод количественной оценки адгезивной активности на модели клеточной линии аденокарциномы двенадцатиперстной кишки человека NuTu 80 позволяет определить уровень этой активности и дать заключение о наличии прямой корреляционной связи между АЛФА и способностью к адгезии у холерных вибрионов Эль Тор, различающихся по эпидемической значимости и источнику выделения.

6. Анализ «потенциально эпидемически опасных» вибрионов Эль Тор, характеризующихся генотипом *ctxABtcpA*⁺, показывает, что именно эта группа штаммов обладает наиболее выраженным персистентным потенциалом, по сравнению с эпидемически опасными и эпидемически не опасными штаммами, максимально высокими показателями адгезивной и антилактоферриновой активностей.

Апробация работы. Материалы диссертации доложены на конференциях молодых ученых ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора (2010 г., 2015 г.), на заседаниях проблемной комиссии «Холера и патогенные для человека вибрионы» межведомственного научного совета по санитарно-эпидемиологической охране РФ (2010 - 2015), на Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых и специалистов Роспотребнадзора (п. Оболенск, 2011 г.), представлены в материалах 18й, 19й, 20ой, 21ой Российских гастроэнтерологических недель (Москва, 2012, 2013, 2014, 2015).

Исследования выполнены в рамках двух плановых тем № 097-4-07 «Свойства, обуславливающие персистенцию холерных вибрионов» и № 151-4-12 «Влияние стрессорных воздействий на свойства, обуславливающие персистенцию холерных вибрионов в организме человека и объектах окружающей среды».

Публикация результатов исследования. Материалы исследований отражены в 17 научных работах, 4 - в периодических изданиях из перечня ведущих рецензируемых научных журналов, утвержденных ВАК Министерства образования и науки России и рекомендованных для публикации основных научных результатов диссертации на соискание ученой степени.

Структура диссертации. Диссертация изложена на 145 страницах, состоит из введения, главы обзора литературы, четырех глав собственных исследований (в том числе одной главы с описанием материалов и методов), заключения и выводов, иллюстрирована 17 рисунками и 22 таблицами. Библиография содержит ссылки на 273 публикации (в т.ч. 132 работы отечественных и 141 - зарубежных авторов).

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы. В работе использовано 73 штамма *V. cholerae* O1 и O139 серогрупп, выделенных на территории России, Индии, Афганистана от людей и из воды открытых водоемов в период с 1942 по 2006 гг., 10 штаммов условно-патогенной микрофлоры и два штамма *E.coli*, содержащие и не содержащие ген *HA/P* холерного вибриона. Перед началом работы штаммы холерных вибрионов были охарактеризованы в соответствии с Методическими указаниями 4.2.2218-07 «Лабораторная диагностика холеры».

Для определения антилактоферриновой активности использовали методику, разработанную И.В. Вальшевой с соавт. в 2003 году [Вальшева И.В. с соавт., 2003], с нашими модификациями, т.к. необходимо было проводить исследования с возбудителями II группы патогенности. Для интерпретации результатов нами были введены условные значения уровней АЛФА: 0 – 40 – низкий; 41 – 70 – средний; от 71 и более – высокий.

При изучении природы антилактоферриновой активности была изучена роль лектинов в процессе связывании лактоферрина. Для этого провели опыты по изучению возможности их рецепции с различными углеводами и определения на этом фоне уровня АЛФА. Перед определением АЛФА взвесь холерных вибрионов инкубировали с 1% растворами маннозы, глюкозы, D-галактозы, D-галактозамина, D-глюкозамина. О роли лектинов в АЛФА судили по снижению ее уровня после контакта холерных вибрионов с сахарами в результате блокировки ими поверхностных лектиновых рецепторов и как следствие – снижение или отсутствие связи с лактоферрином.

Определение антикомплементарной, антилизацимной активностей и билерезистентности проводили согласно методикам, приведенным в

«Методических рекомендациях по изучению свойств, обуславливающих персистенцию холерных вибрионов», которые адаптированы с точки зрения требований биологической безопасности при работе с микроорганизмами II группы патогенности».

Рибонуклеазную активность определяли по методике Т. Маниатиса с соавт., [Маниатис Т., 1984] с использованием аппаратуры GelDoc 1000/2000 гель документирующей системы (BioRad).

Для определения уровня адгезии холерных вибрионов, использовали методику A.Carrello [Carrello A., 1988], но со своими модификациями. Адгезивные свойства бактерий определяли по числу вибрионов, связавшихся со 100 клетками NuTu 80, и рассчитывали индекс адгезии по формуле:

$$ИА = \frac{\Sigma КБ}{100К}$$
 где:

$100К$

$ИА$ – индекс адгезии, $\Sigma КБ$ - количество клеток бактерий, прикрепившихся к 100 клеткам линии NuTu 80, $100К$ – 100 клеток линии NuTu 80

По полученным результатам введены критерии оценки уровня адгезии: меньше 10 – низкий, от 10 до 20 – средний, выше 20 высокий.

ПЦР-генотипирование проводили по набору следующих детерминант: *tagA* - кодирующий продукцию муциназы, способствующей адгезии холерных вибрионов; *prtV*-протеазы, способной вызывать гибель питающихся бактериями нематод, входящий в состав *hly*-локуса; *VC1649* - кодирующего продукцию сериновой протеазы, участвующей в деструкции ворсин и повреждении слизистой кишечника; *VC1650* - коллагеназы, вероятного фактора персистенции в различных экологических нишах; *hapA* – гемагглютинин/протеаза; *hapR* – регуляторный белок и *mshA* – маннозочувствительные пили адгезии. Электрофоретические исследования проводили в 7,5% ПААГ по Леммли [Остерман Л.А., 1981].

Антилактоферриновая активность холерных вибрионов

На первом этапе работы было установлено, что все холерные вибрионы в разной степени обладают антилактоферриновой активностью. При этом были выявлены различия в уровнях АЛФА у *Vibrio cholerae El Tor*, *Vibrio cholerae O139* и *Vibrio cholerae classical*. Наиболее высокий показатель был в группе Эль Тор вибрионов, несколько ниже – у вибрионов O139 серогруппы, холерные вибрионы классического биовара практически не обладали АЛФА. Полученные результаты позволили сравнить активность данного фактора в группах штаммов *V.cholerae El Tor*, различающихся по источнику выделения и по эпидемической значимости.

Было установлено, что у вибрионов Эль Тор, выделенных от больных, вибрионосителей и сточной воды, средние показатели АЛФА были высокими, штаммы, выделенные из воды открытых водоемов, характеризовались средней активностью. Это указывает на бóльшую роль АЛФА в персистенции холерных вибрионов в организме человека, чем в объектах окружающей среды.

Особый интерес в этих опытах представляли штаммы, выделенные от больных и вибрионосителей в 2005 году в Каменском районе Ростовской области, которые характеризовались очень высокой антилактоферриновой активностью (81-100 нг/мл). Поскольку в этой группе штаммов 94% составляли культуры, выделенные от вибрионосителей, можно высказать предположение, что высокая антилактоферриновая активность у холерных вибрионов может способствовать формированию вибриононосительства (являющегося одним из основных «показателей» персистенции) особенно у штаммов, лишенных генов токсинпродукции, но сохранивших гены токсинрегулируемых

пилей адгезии (*ctxAB⁻tcpA⁺*). Это предположение нашло дополнительное подтверждение при анализе АЛФА у штаммов холерных вибрионов, ранжированных по эпидемической значимости. Максимально высокие показатели АЛФА были зарегистрированы именно в группе потенциально эпидемически опасных (*ctxAB⁻tcpA⁺*) вибрионов.

Показатели в группах эпидемически опасных вибрионов (*ctxAB⁺tcpA⁺*) и эпидемически не опасных вибрионов (*ctxAB⁻tcpA⁻*) отличались незначительно.

У вибрионов O139 серогруппы ни один из изученных штаммов не обладал высокой АЛФА. Максимальные показатели были у штаммов, изолированных из сточной воды. У больных эти показатели были средними. Холерные вибрионы, выделенные из воды открытых водоемов, также обладали средним показателем АЛФА, лишь немного превышающим показатели антилактоферриновой активности у штаммов, выделенных от больных. Можно предположить, что причина сравнительно низкой АЛФА у холерных вибрионов O139 серогруппы заключается в капсуле, которая создает препятствие для связи лактоферрина с поверхностными структурами клетки и предохраняет тем самым возбудитель холеры от его воздействия. Возможно, такая защита не требует повышенной индукции фактора, отвечающего за антилактоферриновую активность.

Уровень АЛФА у классических холерных вибрионов, выделенных от больных или умерших от холеры, либо отсутствовал совсем, либо имел низкие значения. По-видимому, особенности патогенеза классической холеры, вызванной высокотоксичными штаммами, не привели к необходимости использования этого фактора для инициации заболевания.

О роли антилактоферриновой активности в патогенезе и персистенции холерных вибрионов служат данные по сравнению АЛФА у

представителей II группы патогенности и условно-патогенной микрофлоры. У последних показатели были ниже, чем у холерных вибрионов O1 и O139 серогруппы в среднем на 40-47%. Вероятно, особенности и тяжесть клинического течения при холере, обуславливают выраженную индукцию так называемых «малых факторов» патогенности, играющих важную роль в персистенции холерных вибрионов в организме человека и объектах окружающей среды, в том числе и АЛФА.

Было установлено, что антилактоферриновая активность обладает прямой корреляционной связью с признаками, характерными для холерных вибрионов Эль Тор, выделенных от людей, антикомплементарной активностью (0,8181) и билирезистентностью (0,695). С признаками персистенции, характерными для вибрионов, изолированных из объектов окружающей среды, антилизоцимной (0,2363) и РНК-азной активностями (-0,3794), связь практически отсутствовала или была слабой. Это подтверждает, что антилактоферриновая активность может рассматриваться как новый признак в составе «персистентного потенциала» холерных вибрионов, активность которого зависит от источника выделения и эпидемической значимости.

В ходе исследований был определен уровень лактоферрина и АЛФА у холерных вибрионов Эль Тор при инфекционном процессе *in vivo* на модели кроликов-сосунков.

Было также изучено влияние на АЛФА кислотного (имитация кислого содержимого желудка) и комбинированного (кислота, щелочное содержимое кишечника, желчи и микроаэрофильных условий) стрессов. Проведенные исследования показали, что кислотный стресс оказывает ингибирующее влияние на антилактоферриновую активность, резкое

снижение во всех группах холерных вибрионов в среднем на 43%. При определении уровня антилактоферриновой активности после действия комбинированного стресса наблюдалось адаптивное увеличение уровня АЛФА практически у всех изученных штаммов вибрионов O1 и O139 серогрупп в среднем на 36% от исходных показателей.

Таким образом, было установлено, что продукция лактоферрина и антилактоферриновая активность являются индуцибельными признаками, поскольку в зависимости от клинических проявлений в макроорганизме и после стрессовых воздействий их показатели меняются.

Природа антилактоферриновой активности

Предстояло выяснить, участвуют ли АЛФА в качестве специфических лигандов лактоферрина лектины. Для уточнения роли лектинов холерных вибрионов в процессе связывания лактоферрина были проведены опыты по изучению возможности их рецепции с различными углеводами из группы гексоз (маннозой, глюкозой и галактозой), аминоксахаров (Д-глюкозамином и Д-галактозамином) и определения на этом фоне уровня антилактоферриновой активности. У всех изученных штаммов наблюдалось снижение уровня АЛФА после инкубации с различными углеводами, но максимально выраженное - в опытах с маннозой, что свидетельствует о потенциальной возможности связи маннозоспецифичных лектинов холерных вибрионов с лактоферрином.

Следующим этапом было определение роли гемагглютинин/протеазы в реализации антилактоферриновой активности. При постановке электрофореза с препаратами нативного лактоферрина и лактоферрина после контакта с гемагглютинин/протеазой было показано, что фермент, (как ранее показали R.A. Finkelstein et al.) [Finkelstein R.A. et al., 1983], вызывает расщепление белка на два фрагмента. Кроме того, для

доказательства участия этого фермента в АЛФА, был определен уровень ее активности у штамма кишечной палочки, несущего в своем геноме клонированный ген гемагглютинин/протеазы *hapA*⁺ (*E.coli pHP61*) и параллельно у штамма, не несущего его (*E.coli pQE30*). Было установлено, что уровень АЛФА у штамма *hapA*⁺ почти в два раза выше, чем у *hapA*⁻, что свидетельствует об участии гемагглютинин/протеазы в расщеплении лактоферрина и, тем самым - в реализации АЛФА.

Исследование генов протеаз холерных вибрионов для установления их роли в АЛФА

Для определения возможности участия в АЛФА других протеаз, помимо *hapA*, ввиду отсутствия соответствующих ферментов, было изучено наличие генов протеаз, с которыми связывают персистенцию микроорганизмов: *tagA*, *VC1649*, *prtV*, а также генов *mshA*, *hapA* и *hapR*.

Все изученные штаммы содержали в своем геноме видоспецифичный ген *hapA*, в группе классических холерных вибрионов, обладающих очень низкой антилактоферриновой активностью, лишь у 67% штаммов обнаружен ген *hapR* – положительный регулятор *HA/P*, у остальных вибрионов с высокой и средней АЛФА эти гены присутствовали в 100% случаев. Ген *prtV* присутствовал у большинства *ctxAB*⁺*tcpA*⁺ и *ctxAB*⁻*tcpA*⁺ и лишь у половины *ctxAB*⁻*tcpA*⁻ штаммов Эль Тор, что не отразилось на их антилактоферриновой активности, обусловленной, в основном, *HA/P*. Ген *tagA* был выявлен только у штаммов, содержащих *tcpA*, что вполне естественно, поскольку оба входят в состав острова патогенности *VPI*. Судя по тому, что лишённые *VPI* штаммы обладают высокой, а многие содержащие *VPI* – низкой АЛФА, этот ген, очевидно, не имеет к ней отношения. Корреляция между частотой обнаружения генов *VC1649* и *VC1650* и показателями АЛФА также отсутствовала.

Анализ распространения в группах штаммов генов *mshA*, кодирующих маннозочувствительные пили адгезии, свидетельствует об определенной зависимости частоты их встречаемости от эпидемической значимости штаммов – наиболее часто они обнаруживаются у *ctxAB⁺tcpA⁺* и *ctxAB⁻tcpA⁺* вариантов, гораздо реже – у *ctxAB⁻tcpA⁻*.

Анализ связи антилактоферриновой активности с адгезией холерных вибрионов

В связи со способностью лактоферрина препятствовать микробной адгезии и колонизации была изучена адгезивная активность холерных вибрионов на модели культуры клеток NuTu 80 с целью определения наличия или отсутствия корреляционных связей между этим важным признаком и АЛФА для решения вопроса о ее роли в адгезии холерных вибрионов. Наиболее высокие показатели адгезии наблюдались у классических холерных вибрионов (21,14), средние - у вибрионов Эль Тор (16,34). Значения у вибрионов O139 серогруппы были невысокими (4,7).

У эпидемически опасных вибрионов Эль Тор (*ctxAB⁺tcpA⁺*) и потенциально эпидемически опасных (*ctxAB⁻tcpA⁺*) (рис.1) холерных вибрионов показатели адгезии были практически в 1,5-2 раза выше, чем у эпидемически не опасных (*ctxAB⁻tcpA⁻*) (рис.2) штаммов. Это можно

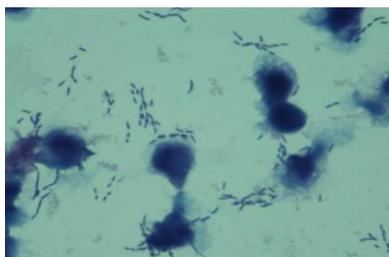


Рисунок 1 - Высокий уровень адгезии на культуре клеток NuTu 80

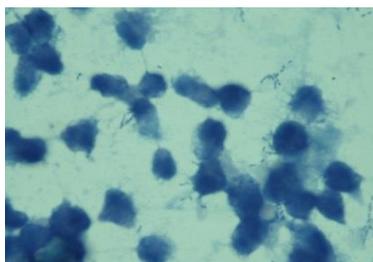


Рисунок 2 - Средний уровень адгезии на культуре клеток NuTu 80

объяснить, в первую очередь, наличием у первых токсинкорегулируемых пилей адгезии, отсутствующих у *ctxAB⁻tcpA⁻ V.cholerae El Tor*. Наиболее высокими показателями обладали штаммы холерных вибрионов с генотипом *ctxAB⁻tcpA⁺*.

Потенциально эпидемически опасные штаммы обладают высоким адгезивным потенциалом, вероятно, не только за счет токсинкорегулируемых пилей адгезии, поскольку они есть и у эпидемически значимых холерных вибрионов. Можно предположить, что маннозочувствительные пили адгезии (*MSHA*), наряду с токсинкорегулируемыми пилями, также могут принимать участие как в связывании лактоферрина, так и в адгезии холерных вибрионов.

При сравнении показаний АЛФА и адгезивной активности была выявлена прямая корреляционная связь между рассматриваемыми показателями. Максимально высокие значения АЛФА и адгезивной активности в группе потенциально патогенных штаммов (*ctxAB⁻tcpA⁺*) обусловили и максимально высокий коэффициент корреляции. Приближающиеся к нему показания зарегистрированы в группе патогенных штаммов (*ctxAB⁺tcpA⁺*). В группе непатогенных штаммов (*ctxAB⁻tcpA⁻*), показатель корреляции был существенно ниже, чем у патогенных и потенциально эпидемически опасных холерных вибрионов, но, тем не менее, достигал средних показателей.

Все вышеизложенное дает основание говорить о роли антилактоферриновой активности, как в патогенезе холеры, так и в персистенции холерных вибрионов (в качестве фактора, расщепляющего и инактивирующего лактоферрин и способствующего адгезии холерных вибрионов на поверхности тонкого кишечника).

Полученные результаты являются вкладом в изучение биологии возбудителя холеры, а именно - в расшифровку особенностей и механизма персистенции *V.cholerae* в различных экологических нишах. Результаты исследования, патент, депонированный штамм, методические рекомендации, могут быть использованы специалистами - микробиологами, изучающими вопросы особенностей персистирования возбудителей инфекционных заболеваний в организме млекопитающих и в объектах окружающей среды. В связи с тем, что холерный вибрион постоянно изменяется, актуальным является дальнейшее изучение природы АЛФА, определение других протеаз холерных вибрионов участвующих в данном процессе, для определения других его защитных свойств в борьбе с макроорганизмом.

ВЫВОДЫ

1. Холерные вибрионы в разной степени обладают антилактоферриновой активностью. Выявлены достоверные различия в уровнях АЛФА у *V.cholerae*, относящихся к разным биоварам и серогруппам. Наиболее высокий показатель зарегистрирован в группе Эль Тор вибрионов, несколько ниже – у вибрионов O139 серогруппы, у холерных вибрионов классического биовара АЛФА практически отсутствует.

2. Значения АЛФА у *V.cholerae El Tor* зависят от источника выделения и эпидемической значимости штаммов. У вибрионов, выделенных от больных, вибрионосителей и сточной воды, показатели АЛФА высокие и составляют 75,4 - 87,1 нг/мл. Штаммы, выделенные из воды открытых водоемов, характеризуются средней активностью (67,3 нг/мл). Максимально выраженной способностью к продукции антилактоферринового фактора обладают потенциально эпидемически опасные вибрионы Эль Тор с генотипом *ctxAB⁺tcpA⁺*. У эпидемически

значимых штаммов (*ctxAB⁺tcpA⁺*) вибрионов Эль Тор и эпидемически не опасных штаммов с генотипом (*ctxAB⁻tcpA⁻*) наблюдаются высокие, приблизительно одинаковые показатели.

3. Установлено, что продукция лактоферрина и антилактоферриновая активность являются индуцибельными признаками, поскольку в зависимости от клинических проявлений в макроорганизме их значения адаптивно меняются.

4. Установлено наличие прямой корреляционной связи АЛФА с признаками персистенции, характерными для холерных вибрионов Эль Тор, выделенных от людей. С признаками персистенции, характерными для вибрионов, изолированных из объектов окружающей среды, корреляция практически отсутствовала или была слабой.

5. У всех изученных штаммов в различной степени имеет место снижение уровня АЛФА после инкубации с углеводами и аминасахарами. Наибольшая активность наблюдается в отношении маннозы, что свидетельствует о потенциальной возможности участия маннозоспецифичных лектинов холерных вибрионов рецепторной связи с лактоферрином, богатым маннозой.

6. Показано наличие прямой корреляционной связи между уровнем адгезии и АЛФА. Это свидетельствует о том, что антилактоферриновая активность, в основе которой лежит связывание и инактивация лактоферрина, способствует процессу адгезии холерных вибрионов и тем самым играет роль в патогенезе холеры.

7. Проведенный анализ на наличие у исследуемых штаммов холерных вибрионов генов протеаз и роли кодируемых ими белков в АЛФА показал, что основная роль в расщеплении лактоферрина принадлежит гемагглютинин/протезе.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в реферируемых научных журналах ВАК РФ

1. Балахнова, В.В. Роль антикомплементарной активности в реализации персистентных свойств холерных вибрионов / В.В. Балахнова, И.Я. Черепихина, О.С. Бурлакова, Р.В. Писанов, В.А. **Подройкина***, Е.В. Сизова // **Здоровье населения и среда обитания.** - №7. – 2010 – С.11-14.

2. Балахнова, В.В. К вопросу о природе антикомплементарной активности холерных вибрионов / В.В. Балахнова, Р.В. Писанов, И.Я. Черепихина, О.С. Бурлакова, **В.А. Подройкина***, Е.В. Сизова, Л.П. Алексеева, В.В. Евдокимова // **Здоровье населения и среда обитания.** - №6. – 2010. – С.14-16.

3. **Подройкина***, **В.А.** Роль антилактоферриновой активности в персистенции холерных вибрионов / **В.А. Подройкина**, В.В. Балахнова, Н.Р. Телесманич, И.Я. Черепихина // **Здоровье населения и среда обитания.**- 2011.- №6.- С. 46-48.

4. **Коршенко, В.А.** Роль антилактоферриновой активности в адгезии холерных вибрионов / **В.А. Коршенко**, И.Я. Черепихина, О.А. Якушева, Л.П. Алексеева // **Фундаментальные исследования.** - №1 (часть 5). – 2015.- С. 967-971.

Другие публикации

1. Черепихина, И.Я. Экологическая детерминированность некоторых факторов персистенции холерных вибрионов / И.Я. Черепихина, В.В. Балахнова, О.С. Бурлакова, О.И. Помухина, О.П. Фецайлова, Е.К. Гончаров, В.А. Трубникова, С.В. Титова, Ю.В. Сизова, **В.А. Подройкина*** // **Холера и патоген. для человека вибр.:** Матер. совещ. и пробл. комис. – Ростов-на-Дону, 2008. – Вып. 21. - С.82-86.

2. **Подройкина***, В.А. Антилактоферриновая активность холерных вибрионов 01 и 0139 серогрупп / **В.А. Подройкина**, И.Я. Черепахина, Н.Р. Телесманич, В.В. Балахнова // **Холера и патоген. для человека вибр.:** Матер. совещ. и пробл. комис. – Ростов-на-Дону, 2010. - Вып.23.. –С.55-59.

3. **Подройкина***, В.А. Антилактоферриновая активность холерных вибрионов / **В.А. Подройкина**, И.Я. Черепахина, В.В. Балахнова, Н.Р. Телесманич // **Холера и патоген. для человека вибр.:** Матер. совещ. и пробл. комис. – Ростов-на-Дону, 2011. – Вып. 24. - С.74-76

4. **Коршенко, В.А.** Анализ свойств, характеризующих способность к персистенции от больных и вибрионосителей / **В.А. Коршенко**, В.В. Балахнова, И.Я. Черепахина // **Холера и патоген. для человека вибр.:** Матер. пробл. комиссии. - Ростов - на-Дону,2012-Вып.25.- С.98-101.

5. Черепахина, И.Я. Фенотипический анализ персистентного потенциала холерных вибрионов / И.Я. Черепахина, В.В. Балахнова, О.С. Бурлакова, **В.А. Коршенко** и др. // **Холера и патоген. для человека вибр.:** Матер. Пробл. комиссии. - Ростов - на-Дону,2012-Вып.25.- С.132-135.

6. **Коршенко, В.А.** Роль гемагглютинин/протеазы в реализации антилактоферриновой активности холерных вибрионов / **В.А. Коршенко**, О.В. Дуванова // **Холера и патоген. для человека вибр.:** Матер совещ. специалистов Роспотребнадзора. - Ростов - на-Дону,2013-Вып.26 С.186-188.

7. Татаренко, О.А. Метод определения уровня адгезии холерных вибрионов на культуре клеток Нер-2 и NuTu-80 / О.А. Татаренко, В.А. **Коршенко**, Л.П. Алексеева, И.Я. Черепахина // **Холера и патоген. для человека вибр.:** Матер совещ. специалистов Роспотребнадзора.- Ростов - на-Дону, 2014.- Вып.27.- С.160-161.

8. **Коршенко, В.А.** К вопросу о генетической детерминированности антилактоферриновой активности холерных вибрионов / В.А. Коршенко, Е.А. Меньшикова, Е.М. Курбатова и др.// **Холера и патоген. для человека вибрионы:** Матер. пробл. комиссии. – Ростов-на-Дону, 2015. – Вып.28. – С.120-124.

Тезисы докладов на конференциях

1. **Подройкина*, В.А.** Антилактоферриновая активность холерных вибрионов / **В.А. Подройкина, В.В. Балахнова, Н.Р. Телесманич, И.Я. Черепихина** // **III научно-практич. конференции молодых ученых и специалистов Роспотребнадзора. Современные технологии обеспечения биологической безопасности.** - Оболensk, 2011.- С.212-214.

2. **Коршенко, В.А.** Антилактоферриновая активность холерных вибрионов / **В.А. Коршенко, В.В. Балахнова, И.Я.Черепихина** // **Рос. журн. гастроэнтерол., гепатол., колопроктол., 2012.** – Прилож., Том 22.-№5.- С.127.

3. **Коршенко, В.А.** Выживаемость холерных вибрионов под действием кислотного стресса / **В.А. Коршенко, И.Я. Черепихина** // **Рос. журн. гастроэнтерол., гепатол., колопроктол., 2013.** – Прилож., Том 22. - №5. – С.127.

4. **Коршенко, В.А.** Роль лектинов в реализации антилактоферриновой активности холерных вибрионов / **В.А. Коршенко, И.Я. Черепихина** // **Рос. журн. гастроэнтерол., гепатол., колопроктол., 2014.- Прилож., Том 24.- №5.- С. 100.**

5. **Коршенко, В.А.** Влияние стресса на антилактоферриновую активность / **В.А. Коршенко** // **Рос. журн. гастроэнтерол., гепатол., колопроктол., 2015.** – Прилож., Том 25.-№5.- С.101.

*фамилия Подройкина В.А. изменена на Коршенко В.А.