

УДК 616.15-07:579.842.11]-078

DOI: 10.14427/jipai.2020.4.48

Характеристика бактерицидной активности периферической крови здоровых доноров против *Escherichia coli*

А.П. Годовалов, И.А. Боев

ФГБОУ ВО "Пермский государственный медицинский университет имени академика Е.А. Вагнера" Минздрава России, г. Пермь

Characteristics of bactericidal activity of healthy donor peripheral blood against *Escherichia coli*

A.P. Godovalov, I.A. Boev

Ye.A. Vagner Perm State Medical University, Perm

Аннотация

В последнее время относительно широко обсуждается роль условно патогенных микроорганизмов в развитии воспалительных заболеваний различной локализации. Известно, что *Escherichia coli* являются этиологическим агентом таких заболеваний, особенно внекишечной локализации, отличительной особенностью которых считается широкий диапазон клинических проявлений. Цель исследования - оценка вклада некоторых компонентов в общую микробицидность периферической крови здоровых доноров.

Материалы и методы. Бактерицидность периферической крови оценивали по числу жизнеспособных *E. coli* после инкубации с пробями крови путем высева на среду Эндо. Оценивали антибиопленочную активность цельной крови и плазмы крови путем непосредственного контакта с биопленкой и последующей её визуализацией по O'Toole. Оценивали фагоцитарную активность нейтрофилов и моноцитов раздельно в микроскопическом варианте теста. Продукцию активных форм кислорода оценивали при помощи реакции люминол-зависимой хемилюминесценции в стимулированном и спонтанном варианте. Для опсонизации *E. coli* применяли препарат иммуноглобулина G.

Результаты и обсуждение. Показано, что периферическая кровь здоровых добровольцев обладает выраженными бактерицидными свойствами в отношении *E. coli*, уменьшая число жизнеспособных бактерий в 2 раза. Опсонизация *E. coli* позволяет снизить количество бактерий в 4 раза. Среди лейкоцитов превалирующее место занимают нейтрофилы, которые быстрее моноцитов активируют свою поглотительную способность и продукцию радикалов. Количество активно фагоцитирующих нейтрофилов после обработки *E. coli* препаратом иммуноглобулина увеличилось до $4,1 \pm 1,0\%$ (без опсонизации - $1,7 \pm 0,3\%$; $p < 0,05$). **Заключение.** В целом, микробицидная активность крови здоровых людей является многосоставной системой, в которой особое место следует отвести факторам опсонизации.

Summary

Recently, the role of opportunistic pathogenic microorganisms in the development of inflammatory diseases of various localization has been relatively widely discussed. It is known that *Escherichia coli* are the etiological agent of such diseases, especially extraintestinal localization, a distinctive feature of which is considered to be a wide range of clinical manifestations.

The aim of investigation was to assess the contribution of some components to the total microbicidal activity of healthy donor peripheral blood.

Materials and methods. The bactericidal capacity of peripheral blood was assessed by the number of viable *E. coli* after incubation with blood samples by plating on Endo medium. The antibioplasm activity of whole blood and blood plasma was assessed by direct contact with the biofilm and its subsequent visualization using O'Toole technique. Phagocytic activity of neutrophils and monocytes was assessed separately in a microscopic version of the test. The production of reactive oxygen species was assessed using the stimulated and spontaneous luminol-dependent chemiluminescence reaction. An immunoglobulin G was used to opsonize *E. coli*.

Results and discussion. It was shown that the peripheral blood of healthy volunteers has pronounced bactericidal properties against *E. coli*, reducing the number of viable bacteria by 2 times. Opsonization of *E. coli* reduces the number of bacteria by 4 times. Among leukocytes, the predominant place is occupied by neutrophils, which activate their absorption capacity and production of radicals faster than monocytes. The number of actively phagocytic neutrophils after *E. coli* treatment with an immunoglobulin G increased to $4.1 \pm 1.0\%$ (without opsonization - $1.7 \pm 0.3\%$; $p < 0.05$).

Conclusion. In general, the microbicidal activity of the blood of healthy people is a multi-component system, in which a special place should be given to the factors of opsonization.

Ключевые слова

Микробицидность, опсонизация, *Escherichia coli*, биопленка, комплемент, фагоцитарная активность, нейтрофилы, моноциты.

В последние годы отмечают увеличение роли условно патогенной микрофлоры в развитии воспалительных заболеваний, что отражается на клинической картине заболеваний, изменении их тяжести и т.д. [1, 2]. Показана широкая представленность *Escherichia coli* у пациентов с бактериемией [3], заболеваниями мочевых путей [4] и женского генитального тракта [5]. Известно, что *E. coli* обладает уникальными свойствами, среди которых лидирующие позиции отводят широкому спектру ферментативной активности, способности к движению, высокой биопленкообразующей активности. Кроме этого, описан феномен транслокации *E. coli* в организме человека, где ключевое место занимает кровеносная система [6]. Именно поэтому от бактерицидной активности крови зависит дальнейшее развитие процесса, когда при нарушении микробицидности можно ожидать развитие внекишечных воспалительных заболеваний, обусловленных *E. coli*.

Цель исследования - изучить роль составляющих компонентов в реализации микробицидной активности периферической крови здоровых доноров против *E. coli*.

Материалы и методы

Кровь получали утром, натощак у 32 практически здоровых доноров. При определении бактерицидной активности цельной крови пробы делили на три порции. В контрольную порцию крови вносили тест-штамм *Escherichia coli* K-12 (10^7 КОЕ/мл), интенсивно перемешивали и после лизирования и разбавления осуществляли высеv на агаризованную среду. Для второй порции крови использовали микроорганизмы того же штамма, но после предварительной опсонизации. В третью порцию помещали не опсонизированные *E. coli*. Для опсонизации использовали иммуноглобулин класса G (IgG) с широким спектром специфических антител, полученный из препарата "Октогам", в концентрации 20 мг/мл по IgG [7, 8]. Опсонизацию проводили в течение часа при 37°C. Высеv из второй и третьей порций осуществляли через 3 часа инкубации при температуре 37°C. Посев образцов для подсчета выросших колоний осуществляли на среду Эндо.

Keywords

Microbicidal activity, opsonization, *Escherichia coli*, biofilm, complement, phagocytic activity, neutrophils, monocytes.

Биопленки *E. coli* K-12 выращивали в плоскодонных полистироловых планшетах в течение 24 ч при 37°C. После этого удаляли питательный бульон и промывали планшеты забуференным физиологическим раствором. На пленки наносили цельную кровь или плазму на 1 ч, инкубацию осуществляли в термостате при 37°C. В контрольные пробы вносили равный объем питательного бульона. Для визуализации биопленок применяли метод O'Toole [9]: толщину биопленок определяли при помощи окраски генцианвиолетом с последующей его экстракцией спиртом и учетом оптической плотности на фотометре.

При определении поглотительной активности лейкоцитов все пробы периферической крови делили на две порции. В 1-ю порцию вносили опсонизированные клетки *E. coli* K-12, в во 2-ю – не опсонизированные микроорганизмы. Сущность метода аналогична таковому, как описано [10], за исключением того, что в качестве объекта фагоцитоза выбраны клетки *E. coli*. Оценка числа нейтрофилов и моноцитов, фагоцитирующих *E. coli*, проведена на микропрепаратах, окрашенных по методу Романовского-Гимза. В каждом препарате учитывали не менее 300 фагоцитирующих клеток. Рассчитывали процент фагоцитирующей клеток каждого типа, фагоцитарное число (среднее число *E. coli* приходящееся на 1 фагоцитирующую клетку), а также абсолютные показатели фагоцитарной активности клеток.

Для определения радикал-продуцирующей активности лейкоцитов при постановке реакции люминол-зависимой хемилюминесценции в стимулированном варианте в лунках планшета (Corning Inc. Costar) смешивали лейкоциты (25×10^6 /мл) и взвесь тест-штамма *E. coli* K-12. В спонтанном варианте реакции смешивали те же компоненты, но вместо тест-штамма вносили раствора Хенкса. Измерение проводили на люминиметре Luminoskan Ascent® Thermo Labsystems (США) в течение 180 мин. Для статистического анализа использовали интегральный показатель хемилюминесценции за весь период измерения (integral, RLU) [11].

Для статистического анализа полученных данных использовали t-критерий Стьюдента. Критический уровень значимости при проверке статистических гипотез принимался равным 0,05.

Результаты исследования

В ходе проведенных исследований установлено, что периферическая кровь практически здоровых доноров обладает выраженными бактерицидными свойствами. Количество жизнеспособных *E. coli* через 180 минут инкубации снизилось в 4 раза до $577,5 \pm 290,1$ КОЕ (в начальный момент - $1915,7 \pm 575,8$ КОЕ; $p < 0,05$). Предварительная обработка клеток *E. coli* препаратом иммуноглобулина существенно повышает бактерицидную активность крови, а количество жизнеспособных бактерий через 180 минут контакта с кровью снижается в 10 раз от исходного - $166,25 \pm 80,77$ КОЕ ($p < 0,05$ к контрольной пробе в 0 минуту).

Штамм *E. coli* К-12 обладает выраженной биопленкообразующей активностью. После инкубации такой биопленки с питательным бульоном в течение 1 ч её масса составляет $0,611 \pm 0,044$ у.е. опт. плотности. При нанесении на пленку *E. coli* цельной крови на 1 ч и последующей промывке, толщина биопленки уменьшается в 2 раза - до $0,339 \pm 0,028$ у.е. опт. плотности ($p < 0,05$). Инкубация биопленки *E. coli* со свежей плазмой доноров практически полностью разрушает её ($0,202 \pm 0,020$ у.е. опт. плотности; $p < 0,05$). При микроскопии окрашенных биопленок установлено, что при их инкубации с цельной кровью, часть клеток (эритроциты и лейкоциты) оседает в биопленке, что может нивелировать эффект цельной крови при использованном методе оценки биопленкообразования.

При оценке фагоцитарной активности нейтрофильных гранулоцитов показано поглощение преимущественно 1-2 микробных клеток *E. coli* одним нейтрофилом, процент фагоцитирующих нейтрофилов - $10,9 \pm 1,3\%$. Внесение в систему иммуноглобулина увеличивает число поглощаемых *E. coli* до 3 бактерий на один нейтрофил, а относительное число фагоцитирующих нейтрофилов до $18,1 \pm 1,7\%$ ($p < 0,05$). Количество активно фагоцитирующих нейтрофилов после обработки *E. coli* препаратом иммуноглобулина увеличилось до $4,1 \pm 1,0\%$ (без опсонизации - $1,7 \pm 0,3\%$; $p < 0,05$). Аналогичные изменения характерны и для моноцитов. Удельный вклад в поглотительную активность для нейтрофилов - $91,1 \pm 2,5\%$, для моноцитов - $8,9 \pm 2,5\%$. Опсонизация *E. coli* препаратом иммуноглобулина G не меняет удельный вклад отдельных лейкоцитов в поглощение объектов.

Известно, что поглощение микробных клеток активирует респираторный метаболизм в нейтрофильных гранулоцитах и моноцитах. Так, по результатам реакции люминол-зависимой хемилюминесценции установлено, что нативные

клетки *E. coli* стимулируют в лейкоцитах продукцию активных форм кислорода ($455,5 \pm 87,7$ RLU; в спонтанном варианте реакции - $192,1 \pm 20,0$ RLU; $p < 0,05$). Более того, после непродолжительной тепловой обработки кишечных палочек (при 56°C 30 минут), продукция радикалов значительно увеличивается ($773,4 \pm 137,2$ RLU; $p < 0,05$). Обработка эшерихий свежесвятой сывороткой доноров увеличивает продукцию активных форм кислорода до $1789,1 \pm 528,1$ RLU для нативных бактерий ($p < 0,05$ при сравнении с неопсонизированными объектами) и $1222,8 \pm 182,5$ RLU для термообработанных клеток ($p < 0,05$ при сравнении с неопсонизированными объектами). Инактивация сывороточного комплемента, путем прогревания сыворотки крови при 56°C в течение 30 минут, снижает продукцию реактивных форм кислорода, что указывает на существенный вклад компонентов комплемента в микробицидность лейкоцитов против *E. coli*.

Обсуждение

В целом, показано, что в отношении штамма *E. coli* К-12 кровь практически здоровых доноров обладает выраженным бактерицидным потенциалом, который может быть существенно увеличен при опсонизации бактерий препаратом иммуноглобулина G. Поглощение микроорганизмов обеспечивается преимущественно нейтрофильными гранулоцитами, особенно после опсонизации *E. coli*, что является закономерным процессом [12]. Показано, что скорость фагоцитоза и активации у нейтрофилов выше, чем у мононуклеарных клеток периферической крови [13], что, вероятно, обусловлено разной степенью дифференцировки клеток, циркулирующих в крови. В свою очередь внесение иммуноглобулинов класса G повышает специфичность распознавания объектов фагоцитоза за счет формирования комплекса антигенов и антител. Препарат иммуноглобулина G, использованный в настоящем исследовании, получен из сывороток более чем 3 тысяч доноров [14], что значительно увеличивает репертуар распознавания.

Интересным фактом представляется повышение продукции активных форм кислорода лейкоцитами при стимуляции их опсонизированными *E. coli*. В литературе описано, что усиление хемилюминесценции может быть обусловлено присутствием полиэлектролитов, катионных белков в сыворотке, которые оказывают эффект на продукцию активных форм кислорода через взаимодействие с G-белками [15]. В

ходе исследований показано, что существенную роль при этом оказывают компоненты системы комплемента, что обусловлено вовлеченностью рецепторов системы комплемента в продукцию радикалов.

Все эти данные в совокупности позволяют предполагать, что после проникновения *E. coli* в кровь иммунная система значительно снижает количество жизнеспособных бактериальных клеток за счет активации механизмов микробицидности. Можно ожидать, что снижение продукции антител или белков системы комплемента, зачастую наблюдаемые при белковом голодании,

ослабит эту функцию [16], а *E. coli* успешно транслируются во внекишечные локусы.

Заключение

Таким образом, в реализации микробицидной активности крови здоровых людей принимает участие целый комплекс факторов, среди которых выделяются факторы опсонизирующие эшерихии, как например компоненты системы комплемента, что ускоряет их поглощение лейкоцитами (преимущественно нейтрофилами) и разрушение при помощи активных форм кислорода.

Литература

1. Stromberg Z.R., Van Goor A., Redweik G.A.J. et al. Pathogenic and non-pathogenic *Escherichia coli* colonization and host inflammatory response in a defined microbiota mouse model. *Dis. Model. Mech.* 2018; 11(11): dmm035063. doi: 10.1242/dmm.035063.
2. Mendoza-Palomar N., Balasch-Carulla M., González-Di Lauro S. et al. *Escherichia coli* early-onset sepsis: trends over two decades. *Eur. J. Pediatr.* 2017; 176(9): 1227-1234. doi: 10.1007/s00431-017-2975-z.
3. Oppenheim B. *Escherichia coli* bacteraemia papers. *J. Hosp. Infect.* 2017; 95(4): 363-364. doi: 10.1016/j.jhin.2017.01.004.
4. Vila J., Sáez-López E., Johnson J.R. et al. *Escherichia coli*: an old friend with new tidings. *FEMS Microbiol. Rev.* 2016; 40(4): 437-463. doi: 10.1093/femsre/fuw005.
5. Guiral E., Bosch J., Vila J., Soto S.M. Prevalence of *Escherichia coli* among samples collected from the genital tract in pregnant and non-pregnant women: relationship with virulence. *FEMS Microbiol. Lett.* 2011; 314: 170-3. doi: 10.1111/j.1574-6968.2010.02160.x.
6. Poole N.M., Rajan A., Maresso A.W. Human Intestinal Enteroids for the Study of Bacterial Adherence, Invasion, and Translocation. *Curr. Protoc. Microbiol.* 2018; 50(1): e55. doi: 10.1002/cpmc.55.
7. Дерябин Д.Г., Каримов И.Ф. Особенности реагирования рекомбинантных люминесцирующих бактерий с различными Lux-оперонами в фагоцитарной системе. *Вестник ОГУ.* 2007; 12: 4-7.
8. Шестакова А.В., Кадыралиев Б.К., Годовалов А.П., Быкова Л.П. Опсонизация *Candida albicans* иммуноглобулином для внутривенного введения. *Мед. иммунол.* 2015; 5: 434.
9. O'Toole G.A. Microtiter dish biofilm formation assay. *J. vis. exper.* 2011; 47(4): 2437. doi: 10.3791/2437.
10. Shilov J.I., Orlova E.G. Role of adrenergic mechanisms in regulation of phagocytic cell functions in acute stress response. *Immunology Letters.* 2003; 86: 229-233. doi: 10.1016/s0165-2478(03)00027-0.
11. Шилов С.Ю., Шилов Ю.И., Барков С.Ю. Влияние дегидроэпиандростерона на показатели люминолзависимой хемилюминисценции при зимозановом перитоните у старых крыс. *Российский иммунологический журнал.* 2017; 11(20) (3): 570-572.
12. Dawson D.R., Nydam D.V., Price C.T. et al. Effects of opsonization of *Rhodococcus equi* on bacterial viability and phagocyte activation. *Am. J. Vet. Res.* 2011; 72(11): 1465-75. doi: 10.2460/ajvr.72.11.1465.
13. Antal P., Sipka S., Surányi P. et al. Flow cytometric assay of phagocytic activity of human neutrophils and monocytes in whole blood by neutral red uptake. *Ann. Hematol.* 1995; 70(5): 259-65. doi: 10.1007/BF01784045.
14. Schwab I., Nimmerjahn F. Intravenous immunoglobulin therapy: how does IgG modulate the immune system? *Nat. Rev. Immunol.* 2013; 13(3): 176-89. doi: 10.1038/nri3401.
15. Takahashi R., Edashige K., Sato E.F. et al. Luminal chemiluminescence and active oxygen generation by activated neutrophils. *Arch. Biochem. Biophys.* 1991; 285(2): 325-30. doi: 10.1016/0003-9861(91)90367-r.
16. Skattum L., van Deuren M., van der Poll T., Truedsson L. Complement deficiency states and associated infections. *Mol. Immunol.* 2011; 48(14): 1643-55. doi: 10.1016/j.molimm.2011.05.001.

Сведения об авторах:

Годовалов Анатолий Петрович - ФГБОУ ВО "Пермский государственный медицинский университет имени академика Е.А. Вагнера" Минздрава России, центральная научно-исследовательская лаборатория, кафедра микробиологии и вирусологии, тел. 8-912-98-15-100, e-mail: A.Godvalov@gmail.com.

Боев Иосиф Александрович - ФГБОУ ВО "Пермский государственный медицинский университет имени академика Е.А. Вагнера" Минздрава России, кафедра хирургической стоматологии и челюстно-лицевой хирургии, тел. 8-904-84-39-970, e-mail: iosifboev@gmail.com.

Поступила 15.12.2020 г.