

УДК 576.8.577.3

К. О. Овнанян, член-корреспондент НАН РА А. А. Трчунян

Ультраструктурная архитектура межклеточных контактов в биопленках бактерий *in vitro* и *in vivo*

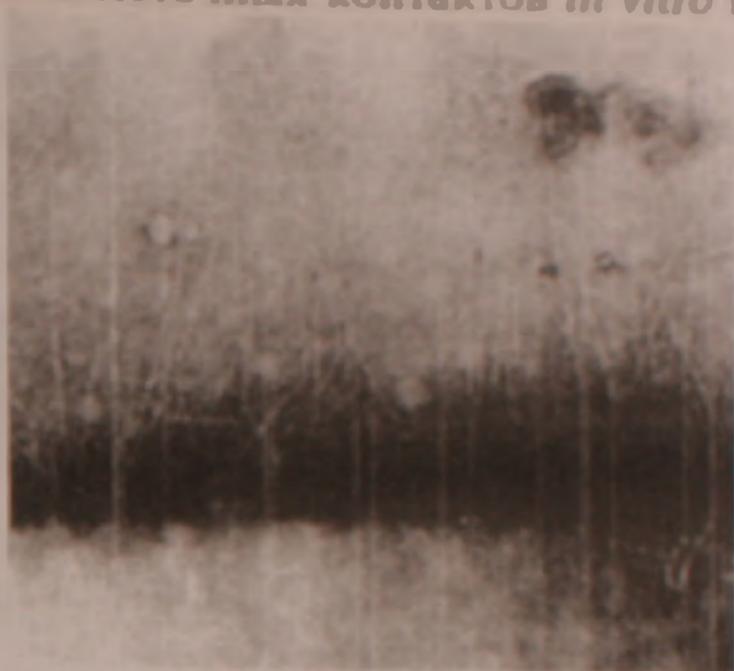
(Представлено 26/II 2009)

Ключевые слова: мембранные структуры, межклеточные контакты, бактерии, биопленки

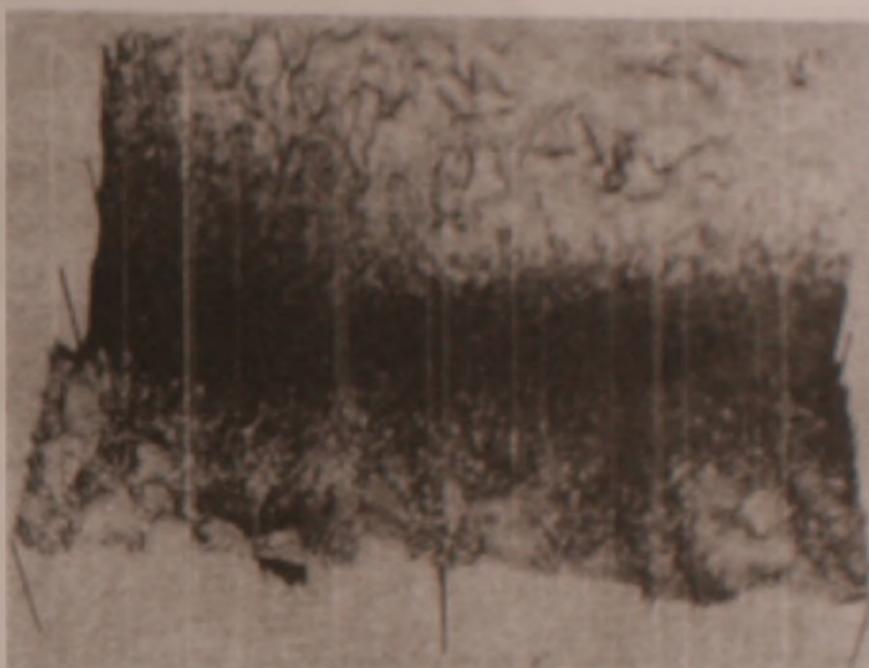
Процессы формирования биопленок бактерий как на слизистой поверхности полостей организма человека и животных, так и во внешней среде являются одним из актуальных вопросов экологии микроорганизмов и имеют важное медико-биологическое значение; они являются не менее ценными для развития нанобиологии и разработки новых биотехнологий [1-5].

Известно, что колонии бактерий представляют популяцию определенного количества микроорганизмов в результате размножения особи одного или нескольких видов или штаммов бактерий. Еще в XX в. ряд исследователей [6-9], изучая бактериальные популяции, отличали колонии R, S, I типов. Несмотря на то, что особенности колонии всегда представляли большой интерес, многие вопросы механизма формообразования межклеточных контактов оставались неразрешенными, и только применение современной электронной микроскопии открыло возможность более детального изучения молекулярной организации структурных компонентов бактериальной клетки и колонии, при этом на достаточно больших плоских поверхностях близко расположенные клетки или колонии формируют биопленки определенных структур [1,5,10-12]. Проведение настоящего исследования продиктовано недостаточной изученностью морфофункциональных аспектов межклеточных контактов в биопленках прокариот, находящихся в различных экологических нишах.

В данной работе поставлена цель выяснить ультраструктурные особенности формообразования биопленок (колонии) некоторых бактерий и установить строение межклеточных контактов *in vitro* и *in vivo*.



а



б

Рис. 1. Фимбрии у энтеропатогенных *E. coli* (серогруппа O124). а – Негативное контрастирование ПЭМ. Ув. 50 000; б – Негативное контрастирование. ПЭМ. Ув. 100 000. Стереометрическая программа "Видео-тест, структура-5, нанотехнология".

Основными объектами исследования служили бактерии, относящиеся к разным таксономическим группам: энтероинвазивные *Escherichia coli* (серогруппа O124), *Shigella flexneri* (штамм 130), *Salmonella typhimurium* (штамм 546), *Salmonella typhi* (штамм 925), *Staphylococcus aureus* (штамм 906), молочнокислые бактерии (штамм 317/402 "Наринэ") [2], биообразцы слизистой оболочки желудочно-кишечного тракта больных хеликобактериозом (предоставлены Медицинским центром – Институтом здоровья детей и подростков "Арабкир", г. Ереван), колитами (предоставлены Медицинским центром "Армения", г. Ереван), а также экспериментальных моделей животных. Для изучения поверхностных структур бактерий применяли электронно-микроскопические методы негативного контрастирования 2%-ным раствором

фосфорновольфрамовой кислоты при pH 6.8-7.0, а также позитивное окрашивание с помощью 1%-ного водного раствора уксуснокислого уранила [13]. Для электронномикроскопического исследования ультратонких срезов бактериальные колонии фиксировали в 2.5%-ном растворе глутаревого альдегида на 0.1 М какодилатном буфере по общепринятой методике [14]; после фиксации с помощью четырехоксида осмия, обезвоживания и пропитки в аралдите срезы заливали смесью аралдитов. Определение локализации полисахаридов проведено по методу Лафта [15]. Получение ультратонких срезов исследуемого материала проводили на ультрамикротоме типа "Ultracut" фирмы Reichert (Австрия), а просмотр препаратов – с помощью просвечивающего электронного микроскопа (ПЭМ) типа Tesla BS-500 (Чехословакия). Компьютерный анализ изображений проведен по программе "Видео-тест, структура-5. Нанотехнология".



Рис. 2. Тесный контакт клеток *Sh. flexneri* (штамм 130). Ультратонкий срез. ПЭМ. Ув. 30 000.

Как показал ультраструктурный анализ колоний бактерий *in vitro*, они имеют типичное тонкое строение для грамотрицательных и грамположительных бактерий. Выяснение структурных особенностей зоны межклеточных контактов осуществлено с более детальным представлением поверхностных структур и клеточных стенок. Исследование поверхностных структур грамотрицательных бактерий (эшерихий, шигелл, салмонелл) в колониях выявило различные формы межклеточных контактов: у энтеропатогенных штаммов *E. coli* с адгезивными свойствами это фимбрии-образования (рис.1,а), которые принимают участие как в передаче плазмид, так и в прикреплении к другим особям и субстрату, образуя трехмерную картину.

С помощью компьютерной программы удалось реконструировать стереометрическую ориентацию пили (рис.1,б). Размеры пили колеблются в пределах от 100 до 200 мкм, а диаметр составляет около 8 нм.

Другие разновидности межклеточных контактов у изученных бактерий *in vitro* проявляются в виде плотных слипаний наружной мембраны клеточной стенки у шигелл (рис.2) и других грамотрицательных бактерий, а также плотных контактов пептидогликановой капсулы стафилококков и других грамположительных бактерий (не показано).

Установлено также наличие цитоплазматических перемычек между бактериями (не показано), дополняющее формы межклеточных связей в архитектонике микробного сообщества.

При росте бактерий под действием антибиотиков в процессе Л-трансформации в культуре салмонелл происходит слияние протопластов и формирование симпластов (не показано). Полученные результаты подтверждают имеющиеся данные об образовании симпластов под действием антибиотиков [16]. У некоторых протопластов выявлены контакты и слияние клеток с образованием бактериальных синцитий и симпластов, что представляет практический интерес, дающий возможность использовать их для скрещивания и конструирования штаммов с полезными свойствами [16,17]. Фактически исследование расположенных на различных плоскостях бактерий, формирующих биопленки, позволило установить межклеточные контакты, обусловленные наличием фимбрий и перемычек, плотные контакты, слияние клеточных стенок и, наконец, слияние протопластов с образованием симпластов.



Рис. 3. Действие молочнокислой смеси на клетку *S. aureus* (штамм 906).

Ультратонкий срез. ПЭМ. Ув. 30 000.

Наряду с синергическими формами взаимоотношения у изученных и других [4, 18] видов бактерий в смешанных культурах стафилококков и молочнокислых бактерий имеют место антагонистические взаимодействия: в результате бактериостатического действия молочнокислых бактерий происходят структурные изменения в капсуле клеточной стенки стафилококков (рис.3). Изменение природы и формы взаимоотношений между бактериями в смешанных культурах подтверждает возможность проявления новых функций их сообществ в природе [18]. Эти данные могут найти применение для

профилактики и лечения дисбактериозов и различных стрепто-стафиликовых инфекций [2].

Известно, что капсула — важный компонент поверхности клеточной стенки, с помощью которой происходит адгезия других бактериальных клеток при формировании колонии, а также различных субстратов органической и неорганической природы [19]. Способность бактерий продуцировать капсулы используют для получения синтетических биопленок. Нами установлено, что как капсула грамположительных бактерий, так и "микрокапсула" грамотрицательных бактерий соединены с наружной поверхностью клеточной стенки и имеют фибриллярную структуру. С помощью электронноцитохимической реакции по определению локализации полисахаридов выявлен тонкий капсулоподобный слой полисахаридов на наружной мембране клеточной стенки *Sh. flexnerii*.

Помимо капсулы, имеющей определенную структуру, обнаружен и бесструктурный капсулоподобный покров, легко отделяющийся от поверхности клетки, но иногда имитирующий капсулу. Значительные различия в структуре и химическом составе капсул у разных видов бактерий позволяют предположить, что выполняемые ими функции могут быть неодинаковыми у разных бактерий. Общее, что определяет капсулы и микрокапсулы, — это наличие определенной структуры, выявляющейся с помощью электронного микроскопа, а также прочность их связи с клеточной стенкой.

Фактически исследование бактерий, расположенных на различных плоскостях, позволило установить межклеточные контакты, обусловленные наличием фимбрии и перемычек, плотный контакт, слияние клеточных стенок и, наконец, слияние протопластов с образованием симпластов.

Капсулоподобный слой был визуализирован нами у *S. typhi* при взаимодействии с перитонеальными мышинными макрофагами (не показано). Некоторые авторы подобные межклеточные контакты объясняют степенью гидрофобности клеточной поверхности бактерий и их антиопсонинным цитопротекторным действием [20]. Подтвержден факт размножения и формообразования микроколонии салмонелл. Следует заметить, что аналогичные данные о размножении и образовании микроколонии в фагосомах эукариотических клеток были установлены при электронномикроскопическом исследовании взаимодействия *Legionella pneumophila* со свободноживущими амёбами [21].

При исследовании взаимоотношений бактерий с эукариотическими клетками и эпителиальной поверхностью полостей макроорганизма *in vivo* была установлена другая разновидность межклеточных контактов в системе прокариот-эукариот, которая проявляется адгезией и формообразованием

биопленок хеликобактер и бактерий кишечной группы на гликокаликсе поверхности эпителия слизистой желудка, а также энтероцитов и колоноцитов, соответственно слизистой оболочки тонкого и толстого (рис. 4) кишечника.

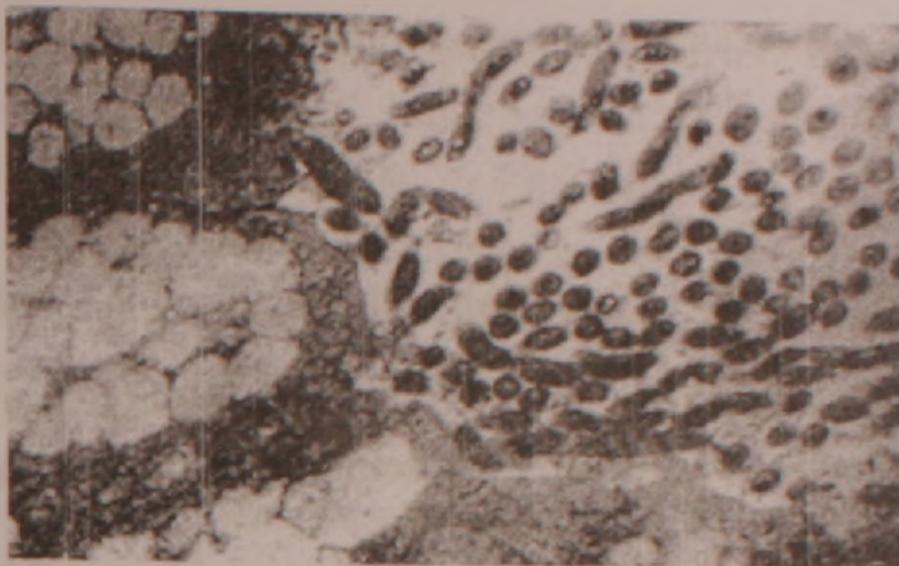


Рис. 4. Биопленка (колония) кишечных бактерий на поверхности слизистой оболочки толстого кишечника. ПЭМ. Ув. 10 000.

Изученные формы локализации микроколонии бактерий *in vitro* и *in vivo* можно условно разделить по следующим показателям: колонии в искусственных питательных средах; колонии во внешней среде на органической и неорганической поверхностях; колонии в полостях в живом организме человека, животных, беспозвоночных, простейших; колонии в тканях в организме человека и животных; микроколонии в эукариотических клетках *in vitro* и *in vivo*.

Таким образом, выявленные ультраструктурные особенности межклеточных контактов прокариот-прокариот и прокариот-эукариот позволяют считать, что процесс формирования биопленок у микроорганизмов зависит как от ультраструктурной цитоархитектоники поверхности микроорганизмов, так и от функционально-морфологических показателей субстрата.

Институт молекулярной биологии НАН РА
Ереванский государственный университет

К. О. Овнанян, член-корреспондент НАН РА А. А. Трчунян

Ультраструктурная архитектура межклеточных контактов в биопленках
бактерий *in vitro* и *in vivo*

Ультраструктурные особенности межклеточных взаимодействий грамотрицательных и грамположительных бактерий, изученных в биопленках методами

электронной микроскопии и компьютерного анализа изображений, проявляются в виде контактов фимбрии, слипания мембран и слияния клеток бактерий

Показан характер взаимодействия как внеклеточных, внутриклеточных и внутритканевых бактерий, их биопленок с эукариотическими клетками макроорганизмов *in vitro* и *in vivo*, так и с поверхностями органических и неорганических объектов внешней среды.

Կ. Օ. Նովնանյան, ՏՏ ԳԱԱ թղթակից անդամ Ա. Ն. Թոչունյան

In vitro եւ in vivo կենսաշերտերում մանրէների միջբջջային հարաբերությունների ուլտրակառուցվածքային ճարտարակերտությունը

Էլեկտրոնային մանրադիտարկման եւ համակարգչային պատկերավերլուծության եղանակներով ուսումնասիրված գրամդրական եւ գրամբացասական մանրէների կենսաշերտերում բակտերիաների միջբջջային փոխազդեցությունների ուլտրակառուցվածքային յուրահատկությունները դրսևորվում են միկրոթարթիչների սերպ հպումների, թաղանթների միակցման եւ բջջային միահյուսման ձեւերով:

Տրված է *in vitro* եւ *in vivo* մանրէների, դրանց կենսաշերտերի եւ մակրոօրգանիզմների էուկարիոտ բջիջների հետ միջբջջային փոխհարաբերությունների արտաբջջային, ներբջջային, ներհյուսվածքային, ինչպես նաեւ արտաքին միջավայրի օրգանական եւ անօրգանական օբյեկտների մակերեսների վրա փարբեր փեղակայումների բնութագիրը:

K. O. Hovnanyan, correspondent-member of NAS RA A. N. Trchounian

**Ultrastructural Architectonics of Microorganisms Intracellular Interactions in Biofilms
in vitro and *in vivo***

Studied by electronic microscope as well as by computer picture analysis ultrastructural peculiarities of intracellular interactions of different gram-positive and gram-negative microorganisms in biofilms are being formed as fimbria, close contact, membranes adhesion and cellular plexus.

Extracellular, intracellular, intratissue characteristics have been presented for intracellular interactions with microorganisms, their biofilms and eukaryotic cells in macroorganisms *in vitro* and *in vivo* as well as on environmental organic and inorganic objects surface.

Литература

1. Авакян А.А., Кац Л.Н., Павлова И.Б. Атлас анатомии бактерий, патогенных для человека и животных. М. Медицина. 1972. 182 с.

2. Амбарцумян А.Дз. Молочнокислые бактерии в профилактике внутрибольничных инфекций. Ереван. Ваан. 2002. 248 с.
3. Бабин В.Н., Доморадский И.В., Дубинин А.В. - Рос. хим. журн. 1994. Т. 38. N 6. С. 66-78.
4. Николаев Ю.А., Плакунов В.К. - Микробиология. 2007. Т.76. С.148-163.
5. Смирнова Т.А., Дигенко Л.В., Андреев А.Л., Алексеева Н.В., Степанова Т.В., Романова Ю.М. - Микробиология. 2008. Т. 77. С. 63-70.
6. Пешков М.А. Систематика и биология многоклеточных бактерий порядка Caryophanales Peshkoff. М. Наука. 1977. 262 с.
7. Прозоровский С.В., Кац Л.Н., Каган Г.Я. L-формы бактерий. М. Медицина. 1981. 239 с.
8. Թռչունիյան Ա.Ն. Կենսաբանական թաղանթներ: Երևան. Զանգակ: 2001. 176 էջ.
9. Dierkes L. J. Bacteriol. 1967. V. 93. P. 693-702.
10. Высоцкий В.В., Смирнова-Мутушева М.А., Ефимова О.Г., Бакулина Н.А. - Антибиотики. 1983. 4. С. 271-277.
11. Павлова И.Б, Ленченко Е.М. - Журн. микробиол., эпидемиол. Иммунол. 1998. N 5. С. 13-17.
12. Tappock G.T. - Am. J Clin. Nutr. 2001. V. 73. P. 410-414.41.
13. Овнанян К.О. - ДНАН Армении. 2008. Т. 104. С. 357-361.
14. Sabatini D., Bensch K. and Barnett R.J. - J. Cell Biol. 1963. V. 17. P. 19-58.
15. Luft J. H. J.Cell.Biol.1964. V. 27. P. 61-67.
16. Куклин В.В., Емельянова Л.К., Жганов В.Г, Юстратова Л.С. - Антибиотики. 1983. N10. С. 883-888.
17. Gauthier Y., Isoard P. - Industr. Aliment et Agricol. 1989. V. 106. N1-2. P. 31-33.
18. Hansen S.K., Rainey P.B., Haagensen J.A.J., Molin S. - Nature. 2007. V. 445. P. 533-536.
19. Езепчук Ю.В. Биомолекулярные основы патогенности бактерий М. Наука. 1977.
20. Брудастов Ю.А., Гриценко В.А., Журлов О.С., Чертков К.Л. - Журн. микробиол. эпидемиол. иммунол. 1997. N 4. С. 73-74.
21. Anand S.M., Skinner A.R., Malic A. - J. Hyg. 1983. V. 91. P. 167-178.