

О.П. Лівінська, І.Л. Гармашева, Н.К. Коваленко

*Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України
буль. Академіка Заболотного, 154, Київ МСП, Д03680, Україна*

ВПЛИВ ТЕЙХОЄВИХ КИСЛОТ ПРОБІОТИЧНИХ ЛАКТОБАЦИЛ НА МІКРОБНУ АДГЕЗІЮ ДО ЕПІТЕЛІАЛЬНИХ КЛІТИН

*Досліджено вплив тейхоєвих кислот лактобацил на їх адгезію до букального епітелію людини. Показано, що попередня обробка епітеліоцитів тейхоєвими кислотами спричинювала зниження адгезії штамів *L. plantarum* 11/16, та *L. plantarum* 195D на 39 % та 30 % відповідно. Досліджено вплив тейхоєвих кислот лактобацил на адгезію умовно патогенних штамів мікроорганізмів. Встановлено, що тейхоєві кислоти обох штамів лактобацил викликали зниження адгезивності *S. albicans* на 29-34 %. Тейхоєва кислота штаму *L. plantarum* 195D стимулювала адгезію *S. aureus* в 2,25 рази, а тейхоєва кислота *L. plantarum* 11/16 не впливала на адгезію стафілококів. Також не спостерігалось впливу досліджуваних тейхоєвих кислот на адгезію *E. coli*.*

Ключові слова: адгезія, лактобацили, тейхоєві кислоти, умовно патогенні мікроорганізми.

Адгезивна активність є одним із найважливіших властивостей при селекції пробіотичних штамів молочнокислих бактерій. Здатність адгезувати до епітеліальних клітин обумовлює їх можливість виживати в умовах біотопів макроорганізму та формувати біоплівку, опосередковуючи таким чином пасивний антагонізм щодо умовно патогенних бактерій. На сьогоднішній день вже багато відомо про важливу роль пробіотиків у профілактиці та лікуванні патологічних станів. Тим не менше, мало відомостей про механізми пробіотичної дії молочнокислих бактерій, зокрема їх адгезії до епітеліальних клітин макроорганізму, що обумовлює їх колонізаційну резистентність. Із літературних джерел відомо, що в адгезивному процесі можуть брати активну участь компоненти поверхневого апарату мікробної клітини, зокрема тейхоєві кислоти. Тейхоєві кислоти в основному представляють собою глікофосфатполіоли, що входять до складу клітинної стінки грампозитивних бактерій. Їх структура є високоштамоспецифічною і від її особливостей залежить характер прояву їх функцій. У літературі зустрічаються відомості про участь ліпотейхоєвих кислот в адгезії лактобацил, але у той же час є маловивченою роль тейхоєвих кислот в адгезії лактобацил.

У зв'язку з цим, метою роботи було дослідження впливу тейхоєвих кислот на адгезію до букального епітелію пробіотичних штамів лактобацил та умовно патогенних мікроорганізмів.

Матеріали та методи. У роботі використовували тейхоєві кислоти пробіотичних штамів бактерій роду *Lactobacillus* – *L. plantarum* 11/16 та *L. plantarum* 195D. Досліджували адгезивні властивості як самих штамів молочнокислих бактерій, з яких були отримані тейхоєві кислоти, так і адгезивні властивості умовно патогенних мікроорганізмів, а саме *Candida albicans* УКМ Y-690, *Staphylococcus aureus* В 4001, *Escherichia coli* УКМ В-906. Молочнокислі бактерії вирощували на рідкому середовищі МРС, умовно патогенні мікроорганізми – на м'ясо-пептонному бульйоні. У дослідженнях використовувалися добові культури мікроорганізмів.

Моделлю слугували клітини букального епітелію людини. Адгезію молочнокислих бактерій вивчали "in vitro" з використанням суспензійного тесту [1].

Зразки букального епітелію промивали шляхом двократного центрифугування при 300 об/хв у буфері PBS. Кількість клітин підраховували у камері Горяєва. Готували суспензію епітеліальних клітин у концентрації 10^7 клітин/мл в буфері PBS, які обробляли розчином тейхоєвих кислот у концентрації 2 мг/мл протягом 30 хв при 37 °С. Тейхоєві кислоти отримували згідно з методикою [2]. Використовували два контролі: перший – клітини епітелію, не оброблені тейхоєвими кислотами, другий – клітини, інкубовані за тих самих умов у PBS буфері.

Підготовку бактеріальних клітин здійснювали шляхом центрифугування добової культури лактобацил протягом 5 хв при 3000 об/хв з наступним ресуспендуванням одержаної біомаси в буфері PBS до концентрації 10^8 клітин/мл за стандартом мутності МакФарланда (PML Microbiologicals, США).

© О.П. Лівінська, І.Л. Гармашева, Н.К. Коваленко, 2012

Отримані суспензії бактеріальних та епітеліальних клітин у співвідношенні 1:1 інкубували при 37 °С протягом 30 хв. Після чого готували мазки, фарбували за Грамом та підраховували під мікроскопом кількість мікробних клітин, адгезованих до епітеліоцитів. Вираховували середній показник адгезії, тобто середню кількість бактерій, що прикріпились до однієї епітеліальної клітини (СПА) та індекс адгезивності мікроорганізмів (ІАМ), а саме середню кількість бактерій на одній епітеліальній клітині, що бере участь в адгезивному процесі. Крім того, визначали розподіл епітеліальних клітин за кількістю адгезованих бактерій. Для лактобацил їх поділяли на категорії з кількістю бактеріальних клітин 0, 1-3, 4-6, ≥ 11 , для *C. albicans* – 0, 1-3, 4-10, ≥ 11 , для *S. aureus* та *E. coli* – 0, 1-15, 16-50, ≥ 51 . Дослідження проводили у трьох повторностях. Статистичну обробку даних проводили з використанням програм Excel та Statistica.

Результати та їх обговорення. У результаті проведених досліджень показано, що усі досліджувані штами мікроорганізмів адгезували до букальних клітин, але значення адгезії різних штамів відрізнялися. Так, СПА та ІАМ *L. plantarum* 11/16 були $7,93 \pm 1,46$ та $8,08 \pm 1,61$; *L. plantarum* 195D обидва показники становили $17,55 \pm 2,90$. У випадку адгезії бактерій *S. aureus* СПА та ІАМ складала $25,90 \pm 12,35$ та $26,07 \pm 12,07$ відповідно. СПА та ІАМ бактерій *E. coli* мали однакове значення – $82,01 \pm 40,20$. Найнижчі показники були у випадку адгезії *C. albicans*, для яких СПА та ІАМ становили $3,61 \pm 0,44$ та $3,95 \pm 0,23$ відповідно.

Слід зазначити, що порівнювати ступінь адгезивності умовно патогенних мікроорганізмів та лактобацил є недоцільним, оскільки критерії ступеня адгезивності є відмінними для симбіотичних та умовно патогенних мікроорганізмів. Саме тому при оцінці ступеня адгезії ми окреслювали різні кількісні категорії. Це пов'язано з характерним для адгезії тропізмом бактерій різних систематичних груп щодо клітин та тканин-мішеней.

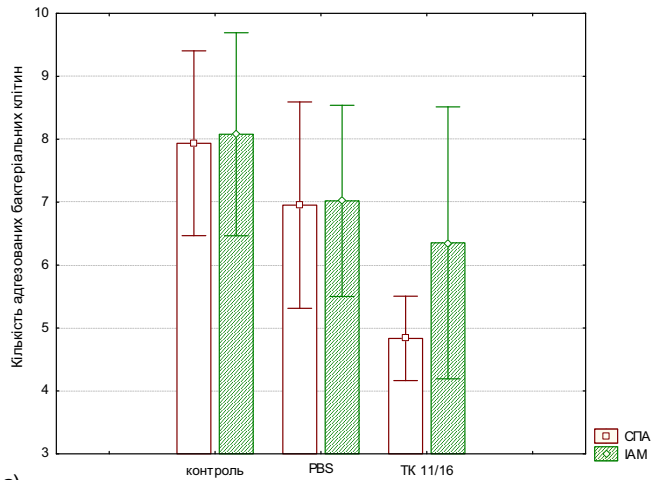
Оскільки всі дослідження проводили з використанням PBS буфера, другим обраним нами контрольним зразком були епітеліальні клітини, попередньо інкубовані протягом 30 хв при 37 °С у PBS буфері. Витримування епітеліоцитів у даному буфері достовірно не впливало на процес адгезії.

З метою оцінки ролі тейхоевих кислот у адгезії штамів молочнокислих бактерій, з яких ці тейхоеві кислоти були виділені, ними обробляли епітеліальні клітини-мішені. Показано, що попередній контакт тейхоевих кислот лактобацил із букальними клітинами призводив до зниження показників СПА штамів *L. plantarum* на 39 % і 30 %. Крім того, препарат тейхоевих кислот штаму *L. plantarum* 195D знижував індекс адгезивності даного штаму на 29,1 % (рис. 1 а, б).

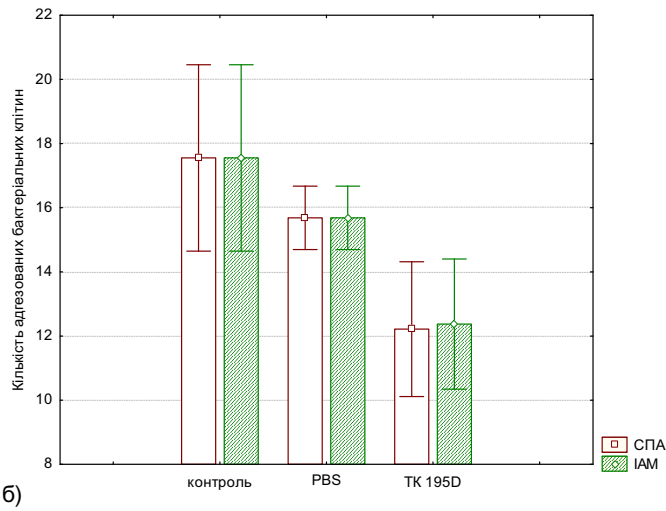
Такі результати можливо пов'язані із частковим блокуванням рецепторів на поверхні епітеліальних клітин, які беруть участь при взаємодії з клітинами бактеріальних штамів. У літературі описані схожі ефекти на прикладі ліпотейхоевих кислот. Так, Chan із співавторами показали, що попередня обробка уроепітеліальних клітин ліпотейхоевими кислотами лактобацил інгібувала їх адгезію [8].

У наших дослідженнях різниця у ступені впливу обробки тейхоевими кислотами на показники адгезії обох штамів *L. plantarum* може свідчити про те, що тейхоева кислота штаму 195D може бути задіяна у процес адгезії більшою мірою, ніж у випадку штаму 11/16, що підтверджується зниженням індексу адгезивності цього штаму. Окрім того, відомо, що адгезія лактобацил також здійснюється за рахунок і інших факторів. За даними літератури, адгезія представників роду *Lactobacillus* може бути націлена на різні субстанції-мішені. Серед них – колаген, фібронектин, ламінін, лектини і олігосахаридні ланцюги [11, 12]. У багатьох роботах вказується на участь у цьому процесі білків S-шару, але в той же час мало ідентифіковано специфічних рецепторів для лактобацил [10]. До числа вивчених рецепторів лактобацил належать маноозспецифічні рецептори, що було показано на прикладі *L. plantarum*, *L. salivarius*, *L. johnsonii*, *L. paracasei* і *L. fermentum*. [4, 5]. Для *L. plantarum* подібний адгезин ідентифіковано як полідоменну білкову структуру, локалізовану на клітинній поверхні [4]. Виходячи з вищенаведеного, можна відзначити, що у штамів досліджуваних лактобацил тейхоеві кислоти беруть участь у адгезії, але це не є її єдиним фактором, тому повного блокування процесу не спостерігалося.

Подальшим етапом наших досліджень було вивчення впливу тейхоевих кислот лактобацил на адгезивні властивості умовно патогенних мікроорганізмів. З одного боку, це було цікавим з погляду виявлення відмінностей у механізмах адгезії бактерій різних таксономічних груп, а з іншого – встановлення їх ролі у прояві пробіотичних властивостей молочнокислих бактерій, як наприклад, конкуренції за сайти адгезії.



а)



б)

Рис. 1. Вплив тейхоевих кислот лактобацил на адгезію до клітин букального епітелію
а) *L. plantarum* 11/16; б) *L. plantarum* 195D.

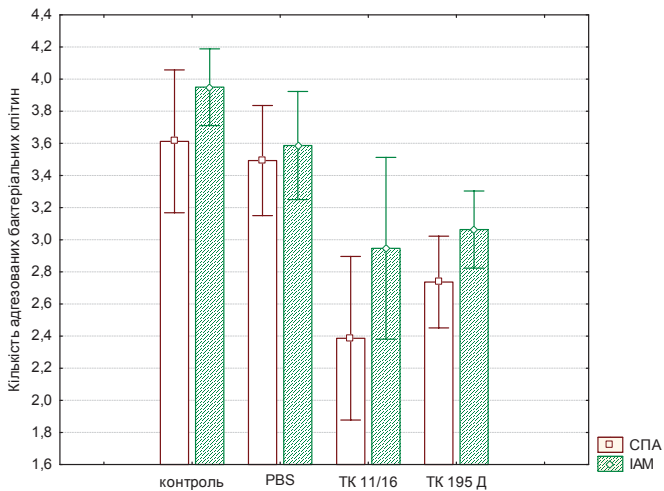


Рис. 2. Вплив тейхоевих кислот *L. plantarum* 195D і *L. plantarum* 11/16 на адгезію
C. albicans до клітин букального епітелію

Як видно з рис. 2, тейхоєві кислоти штамів *L. plantarum* 11/16 та 195D знижували СПА *C. albicans* на 34 % і 29 % відповідно. Якщо у випадку лактобацил зниження адгезивності можна пояснити можливим специфічним блокуванням тейхоєвими кислотами рецепторів на поверхні епітеліальних клітин, то у випадку адгезії грибів роду *Candida* це дійсно викликає інтерес, оскільки відомо, що клітинна поверхня дріжджеподібних грибів не містить у своєму складі тейхоєвих кислот. Тому це може бути пов'язано із спорідненістю адгезинів даних мікроорганізмів, не зважаючи на те, що вони є представниками філогенетично далеких систематичних груп. Із літературних даних відомо, що факторами адгезії *C. albicans* виступають гліко (манно)-протеїни, що взаємодіють із фібрином, ламініном та ентаціном клітин макроорганізму [3].

Додавання тейхоєвої кислоти *L. plantarum* 195D до суспензії епітеліоцитів призводило до значного стимулювання процесу прикріплення клітин *S. aureus* до епітеліальних клітин – СПА та ІАМ зростали у 2,25 рази, тоді як обробка тейхоєвими кислотами штаму 11/16 не впливала на адгезію стафілококів (рис. 3). З одного боку, можна зробити висновок про відмінність між собою біологічних ефектів досліджуваних тейхоєвих кислот, а з іншого, про спорідненість поверхневих структур клітинних стінок стафілококів та тейхоєвих кислот штаму *L. plantarum* 195D. Можливим поясненням отриманих даних є здатність тейхоєвих кислот виступати у даному випадку “містками” між клітинними поверхнями.

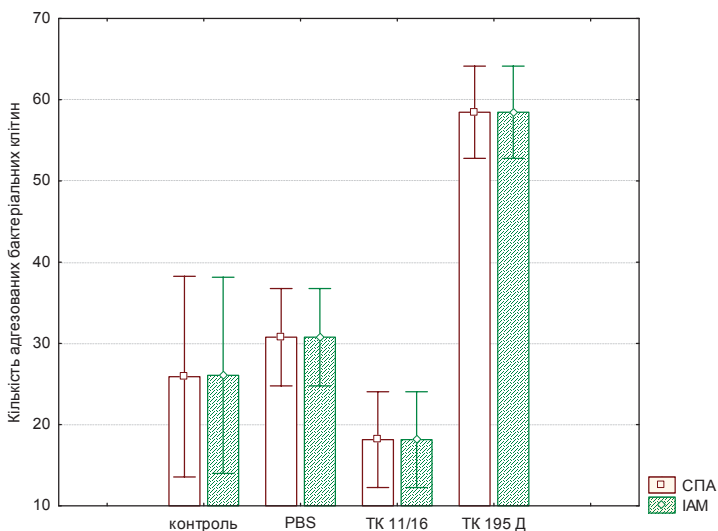


Рис. 3. Вплив тейхоєвих кислот *L. plantarum* 195D і *L. plantarum* 11/16 на адгезію *S. aureus* до клітин букального епітелію

Схожі результати були отримані при обробці тейхоєвими кислотами фібронектину, що викликало зростання до них показників адгезії епідермальних стафілококів [9]. Інші дослідники показали, що обробка уроепітеліальних клітин тейхоєвою кислотою лактобацил знижувала адгезію деяких уropатогенних штамів. Адгезія стафілококів до епітеліоцитів дихальних шляхів може опосередковуватися фібринзв'язуючим білком, що взаємодіє із амінокінцем фібронектину епітеліоцитів [8]. На білкову природу стафілококових адгезинів, що забезпечують їх назальну колонізацію, вказують також інші автори [7]. У той же час, Aly і Levit стверджують, що специфічна адгезія *S. aureus* до назального епітелію здійснюється за безпосередньої участі тейхоєвих кислот, які взаємодіють із NH₂ і COOH-кінцевими ділянками молекули фібронектину. Зокрема мутантні штами *S. aureus*, що не експресували тейхоєві кислоти, втрачали колонізаційний потенціал щодо назальних епітеліальних клітин [6]. Також вони слабше формували біоплівку [15]. Показано також, що ліпотейхоєві кислоти *S. aureus* можуть виступати факторами адгезії до HeLa клітин [13].

При визначенні показників адгезії *E. coli* нами не було виявлено достовірного впливу тейхоєвих кислот обох штамів лактобацил на адгезивні властивості кишкової палички (рис. 4). Відомо, що грамнегативні бактерії не містять тейхоєвих кислот, і відсутність впливу на адге-

живний процес свідчить про залучення інших структур у його здійсненні. Факторами адгезії *E. coli* виступають насамперед фімбрії (пілі).

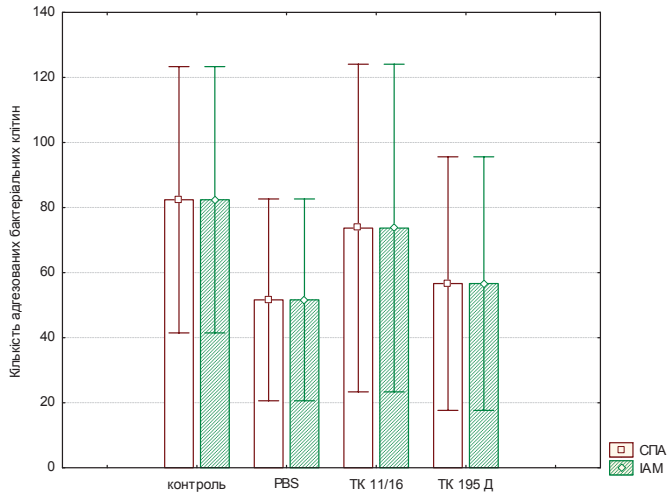


Рис. 4. Вплив тейхоевих кислот *L. plantarum* 195D і 11/16 на адгезію *E. coli* до клітин букального епітелію

Аналіз розподілу епітеліоцитів за кількістю адгезованих до них мікробних клітин відобразив схожу картину, а саме: при вивченні адгезії лактобацил зменшувалася кількість клітин, залучених у адгезивному процесі, а також зменшувався відсоток клітин із більшою кількістю адгезованих бактерій (рис. 5, а, б). Це підтверджує, що тейхоеві кислоти попереджають прикріплення штамів лактобацил, з яких були виділені тейхоеві кислоти, із епітеліальними клітинами. Таку ж картину спостерігали у випадку адгезії дріжджів роду *Candida* (рис. 5, в). Співвідношення епітеліальних клітин при адгезії стафілококів суттєво змінювалося в сторону зростання відсотку клітин із більшою кількістю адгезованих бактерій (рис. 5, г). У випадку адгезії *E. coli* також відбувалася зміна розподілу епітеліоцитів за кількістю адгезованих клітин (рис. 5, д). Після обробки епітеліоцитів тейхоевою кислотою штаму *L. plantarum* 11/16 кількість епітеліальних клітин із більшою кількістю бактерій зменшувалася, а у випадку тейхоевої кислоти клітинної стінки *L. plantarum* 195D – навпаки, збільшувалася, так, як і у випадку адгезії *S. aureus*. Слід відзначити, що при витримуванні епітеліальних клітин у PBS буфері також спостерігалися зміни – відсоток епітеліоцитів із більшою кількістю бактерій знижувався, а із меншим їх числом – зростав.

Варто також сказати, що при підрахунках кількості адгезованих мікробних клітин на букальних клітинах зустрічалися поодинокі епітеліоцити, з істотно більшою кількістю адгезованих бактерій. На це вперше звернули увагу Sandin і співавтори [14]. Автори припускають, що це обумовлено гетерогенністю популяції епітеліоцитів, пов'язаною з їх природним фізіологічним станом (диференціювання чи старіння), який зумовлює різницю поверхневих характеристик епітеліоцитів. Така гетерогенність у популяції епітеліальних клітин має ключове патогенетичне значення. Такі клітини можуть слугувати ділянками, де мікроорганізми, адгезуючи у великій кількості, здатні подолати бар'єрну функцію епітелію та перейти до інвазивного росту. Саме з наявністю таких клітин можна пояснити розвиток вогнищ інфекцій на слизових оболонках різних біотопів макроорганізму, що підтверджується гістологічно.

Таким чином, одержані нами дані свідчать про те, що тейхоеві кислоти лактобацил штамів *L. plantarum* 11/16 та *L. plantarum* 195D залучаються у процес адгезії до клітин букального епітелію, а отже безпосередньо беруть участь у здійсненні пробіотичних функцій, що пов'язані із колонізаційною резистентністю. Зміна розподілу епітеліоцитів за кількістю адгезованих до них мікробних клітин також чітко показує, що тейхоеві кислоти досліджуваних лактобацил впливають на адгезивний процес як даних штамів, так і умовно патогенних мікроорганізмів.

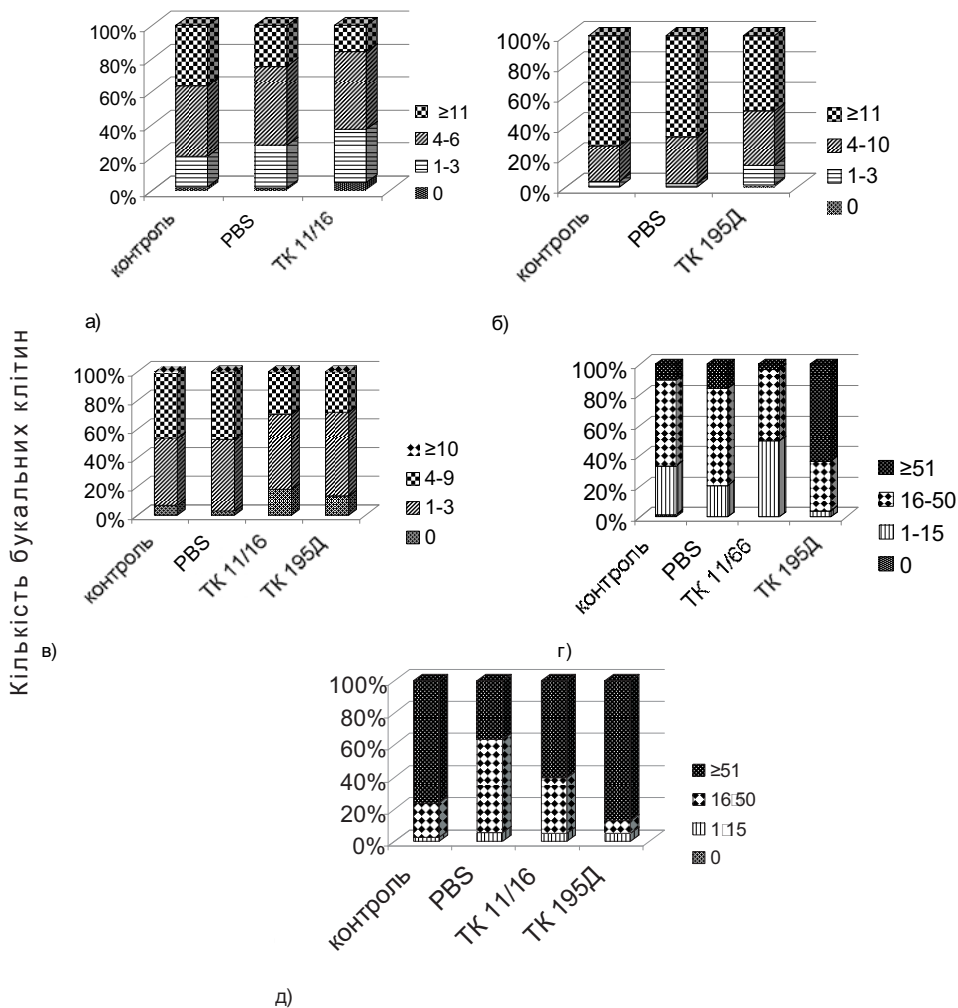


Рис. 5. Розподіл букальних клітин за кількістю адгезованих до них мікробних клітин а) *Lactobacillus plantarum* 11/16; б) *Lactobacillus plantarum* 195D; в) *Candida albicans*; г) *Staphylococcus aureus*; д) *Escherichia coli*.

О.П. Ливинская, И.Л. Гармашева, Н.К. Коваленко

Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины, Киев
ул. Академика Заболотного, 154, Киев ГСП, Д03680, Украина

ВЛИЯНИЕ ТЕЙХОВЫХ КИСЛОТ ПРОБИОТИЧЕСКИХ ЛАКТОБАЦИЛЛ НА МИКРОБНУЮ АДГЕЗИЮ К ЭПИТЕЛИАЛЬНЫМ КЛЕТКАМ

Резюме

Исследовано влияние тейхоевых кислот лактобацилл на адгезию к букальному эпителию человека. Показано, что предварительная обработка эпителиоцитов тейхоевыми кислотами вызывала снижение адгезии штаммов *L. plantarum* 11/16 и *L. plantarum* 195D на 39 % и 30 % соответственно. Исследовано влияние тейхоевых кислот лактобацилл на адгезию условно патогенных штаммов микроорганизмов. Установлено, что тейхоевые кислоты обоих штаммов лактобацилл вызывали снижение адгезивности *C. albicans* на 29-34 %. Тейхоевая кислота штамма *L. plantarum* 195D стимулировала адгезию *S. aureus* в 2,25 раза, а тейхоевая кислота *L. plantarum* 11/16 не влияла на адгезию стафилококков. Также не наблюдалось влияния исследуемых тейхоевых кислот на адгезию *E. coli*.

Ключевые слова: адгезия, лактобациллы, тейхоевые кислоты, условно патогенные микроорганизмы.

THE INFLUENCE OF TEICHOIC ACIDS FROM PROBIOTIC LACTOBACILLI ON MICROBIAL ADHESION TO EPITHELIAL CELLS

S u m m a r y

The effect of teichoic acids from lactobacillus strains on their adhesion to human buccal epithelium has been studied. It is shown that preliminary treatment of epithelium cells by teichoic acids caused a decrease of adhesion of *L. plantarum* 11/16, *L. plantarum* 195D strains by 39 and 30%, respectively. The influence of teichoic acid from lactobacilli on the adhesion of opportunistic microbial strains has been studied. It is established that teichoic acids from both lactobacilli strains brought to the decrease of adhesion of *C. albicans* to 29-34%. Teichoic acid from the strain *L. plantarum* 195D stimulated the adhesion of *S. aureus* 2.25 times, while teichoic acid from *L. plantarum* 11/16 did not influence the staphylococcal adhesion. There was also no effect of the studied teichoic acid on the adhesion of *E. coli*.

The paper is presented in Ukrainian.

К е y w o r d s : adhesion, lactobacilli, teichoic acids, opportunistic microorganisms.

The a u t h o r ' s a d d r e s s : Livinska O.P., Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, National Academy of Sciences of Ukraine; 154 Acad. Zabolotny St., Kyiv, MSP, D 03680, Ukraine.

1. Брилис В.И., Брилене Т.А., Ленцнер Х.П., Ленцнер А.А.. Методика изучения адгезивного процесса микроорганизмов //Лаб. дело. – 1986. – №4. – С.210 – 212.
2. Лівінська О. П., Гармашева І. Л., Васильєв В. М., Коваленко Н. К. Методологічні підходи до виділення тейхоевих кислот із нативних клітин пробіотичних штамів молочнокислих бактерій. // Мікробіол. журн. – 2012. – 74, № 2. – С. 35 – 41.
3. Павленко Е. Ю., Зиядинова М.С. Место кандидозов в инфекционной патологии на современном этапе // Крымский журнал экспериментальной и клинической медицины. – 2011. – 1, № 2. – С. 63–66.
4. Adlerberth I., Ahrne S., Johansson M.L., Molin G., Hanson L.A., Wold A.E. A mannose-specific adherence mechanism in *Lactobacillus plantarum* conferring binding to the human colonic cell line HT-29. // Appl Environ. Microbiol. – 1996. – 62, N 7. – P. 2244–2251.
5. Ahrne S, Nobaek S, Jeppsson B, Adlerberth I, Wold AE, Molin G. The normal *Lactobacillus* flora of healthy human rectal and oral mucosa. // J Appl Microbiol. – 1998. – 85, N 1. – P.88–94.
6. Aly R., Levit S. Adherence of *Staphylococcus aureus* to squamous epithelium: role of fibronectin and teichoic acid. // Reviews of infectious diseases – 1987. – 9, N 4. – P. 341–350
7. Brien M. O., Walsh E., Massey R., Peacock S. *Staphylococcus aureus* clumping factor B (ClfB) promotes adherence to human type I cytokeratin implications for nasal colonization. // Cellular Microbiology. – 2002. – 4, N 11. – P. 759–770
8. Chan R., Reid G., Irvin R., Bruce A., Costerton J. Competitive exclusion of uropathogens from human uroepithelial cells by *Lactobacillus* whole cells and cell wall fragments // Infection and Immunity. – 47, N 1 – P. 84–89
9. Hussain M., Heilmann C., Peters G., Herrmann M. Teichoic acid enhances adhesion of *Staphylococcus epidermidis* to immobilized fibronectin // Microbial Pathogenesis. – 2001. – 3. – P. 261–270
10. Johnson-Henry K.C., Hagen K.E., Gordonpour M., Tompkins T.A., Sherman P.M. Surface layer protein extracts from *Lactobacillus helveticus* inhibit enterohaemorrhagic *Escherichia coli* adhesion to epithelial cells. // Cell Microbiol. – 2007. – 9, N 2. – P.356–367.
11. Kapczynski D., Meinersmann R., Lee M. Adherence of *Lactobacillus* to intestinal cells in culture correlates with fibronectin binding. // Current microbiology. – 2000. – 41. – P. 136–141
12. Lönnemark E., Nowrouzian F., Adlerberth I., Ahrné S., Wold A., Friman V. Oral and faecal lactobacilli and their expression of mannose-specific adhesins in individuals with and without IgA deficiency. // Int J. Med. Microbiol. – 2012. – 302, N 1. – P.53–60.
13. Matsuura T., Miyake Y., Nakashima S., Komatsuzawa H., Akagawa Y. Isolation and characterization of teichoic acid like substance as an adhesion of *Staphylococcus aureus* to HeLa cells // Microbiol. Immunol. – 1996. – 40, N 4. – P. 247–254
14. Sandin R. L., Rogers A. L., Patterson R. J., Beneke E. S. Evidence for mannose-mediated adherence of *Candida albicans* to human buccal cells in vitro // Infect. Immun. – 1982. – Vol. 35. – P.79–85
15. Swoboda J, Campbell J, Meredith T, Walker S. Wall teichoic acid function, biosynthesis, and inhibition. // ChemBioChem. – 2010. – Vol. 1, № 1. - P. 35–45.

Отримано 17.05.2011