

## ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2016

*О.Н.Вишневецкая, О.В.Рыбальченко, И.В.Ларионов\*, О.Г.Орлова, А.Г.Марков*

### **СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ПЛОТНЫХ КОНТАКТОВ ЭПИТЕЛИЯ ТОЩЕЙ КИШКИ КРЫС ПРИ ДЕЙСТВИИ ЛИПОПОЛИСАХАРИДА И ХОЛЕРНОГО ТОКСИНА**

Санкт-Петербургский государственный университет, \*ГосНИИ особо чистых биопрепаратов, Санкт-Петербург

*Цель.* Сравнительное исследование плотных контактов и ультраструктурных изменений энтероцитов слизистых оболочек тощей кишки крыс при действии липополисахаридов и холерного токсина. *Материалы и методы.* Применяли липополисахариды (Sigma-Aldrich, Германия) и холерный токсин (Sigma-Aldrich, Германия). Исследование проводили на крысах линии Wistar. Воздействие липополисахаридов и холерного токсина на эпителиоциты осуществляли методом выведения сегментов тощей кишки крысы и их инкубации с указанными веществами. Проведен сравнительный анализ ультратонких срезов энтероцитов тощей кишки крыс и плотных контактов между ними в контроле и при воздействии липополисахаридов и холерного токсина. *Результаты.* Воздействие липополисахаридов на ультраструктуру энтероцитов тощей кишки крысы проявлялось в изменении формы клеток в результате увеличения межклеточного пространства без деструкции плотных контактов. В некоторых эпителиоцитах отмечено исчезновение десмосом, увеличение ядер и большая выраженность ЭПС. Воздействие холерогена на эпителиоциты слизистой оболочки тощей кишки крысы по ряду признаков сходно с действием липополисахаридов, что проявлялось в изменении ультраструктуры клеток, форма которых также трансформировалась в результате увеличения межклеточного пространства, деструкцией плотных контактов этот процесс не сопровождался. При действии холерного токсина наблюдали исчезновение складчатости латеральной области плазматической мембраны клеток и сокращение числа микроворсинок. *Заключение.* Выявлен сходный характер воздействия липополисахаридов и холерного токсина на ультраструктуру клеток и область плотных контактов энтероцитов тощей кишки крысы, оба вещества вызывали увеличение межклеточного пространства без деструкции плотных контактов.

Журн. микробиол., 2016, № 2, С. 3—9

Ключевые слова: холерный токсин, липополисахарид, энтероциты, плотные контакты, ультраструктура, трансмиссионная электронная микроскопия

*O.N.Vishnevskaya, O.V.Rybalchenko, I.V.Larionov\*, O.G.Orlova, A.G.Markov*

### **COMPARATIVE ANALYSIS OF TIGHT JUNCTIONS OF EPITHELIUM OF RATS JEJUNUM UNDER THE EFFECT OF LIPOPOLYSACCHARIDE AND CHOLERA TOXIN**

St. Petersburg State University, \*State Research Institute of Ultra Pure Biopreparations, St. Petersburg, Russia

*Aim.* Comparative study of tight junctions and ultrastructure alterations of enterocytes of mucous membranes of jejunum of rats under the effect of lipopolysaccharides and cholera toxin. *Materials and methods.* Lipopolysaccharides (Sigma-Aldrich, Germany) and cholera toxin (Sigma-Aldrich, Germany) were used. The study was carried out in Wistar line rats. Effect of lipopolysaccharides and cholera toxin on epitheliocytes was carried out by a method of withdrawal of segments of rat jejunum and their incubation with the specified substances. Comparative analysis of ultrathin sections of enterocytes of jejunum of rats and tight junctions between them was carried out in control and under the effect of lipopolysaccharides and cholera toxin. *Results.* Effect of lipopoly-

saccharides on ultrastructure of enterocytes of rat jejunum manifested in the change of cell form as a result of increase of intercellular space without destruction of tight junctions. Disappearance of desmosomes, increase of nuclei and more pronounced ER were noted in some epitheliocytes. Effect of cholero-gen on epitheliocytes of mucous membrane of rat jejunum by a number of signs is similar to the effect of lipopolysaccharides, that manifested in an alteration of ultrastructure of cell, the form of those also transformed as a result of an increase of intercellular space, this process was not accompanied by destruction of tight junctions. Disappearance of folding of the lateral region of plasmatic membrane of cells and a reduction of a number of microvilli was observed under the effect of cholera toxin. *Conclusion.* A similar character of effect of lipopolysaccharides and cholera toxins on ultrastructure of cells and region of tight junctions of enterocytes of rat jejunum was detected, both substances caused an increase of intercellular space without the destruction of tight junctions.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2016, No. 2, P. 3—9

Key words: cholera toxin, lipopolysaccharide, enterocytes, tight junctions, ultrastructure, transmission electron microscopy

## ВВЕДЕНИЕ

Межклеточные контакты в настоящее время являются пристальным объектом изучения и одним из наиболее приоритетных направлений развития висцеральной физиологии — исследования роли тканевых барьеров в осуществлении транслокации бактериальных токсинов и самих бактерий из желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) в лимфу и системный кровоток. Повышение концентрации микробных токсинов способствует развитию разнообразных патологических процессов в организме человека, при этом одним из лидирующих этиологических факторов являются липополисахариды (ЛПС) — эндотоксины грамотрицательных бактерий. Показано также, что термолабильные энтеротоксины различных условно патогенных энтеробактерий, в том числе *Escherichia coli*, также как и холеро-ген *Vibrio cholerae*, вызывают увеличение проницаемости слизистых оболочек ЖКТ [14]. Барьерная функция эпителия является ключевой при развитии воспалительных заболеваний кишечника, при этом нормальное функционирование эпителия требует постоянного поддержания баланса между реактивностью и толерантностью к микроорганизмам просвета кишечника. При хронических воспалительных процессах, а также при дисбактериозе кишечника условно патогенные микроорганизмы (УПМ), колонизируя слизистые оболочки тонкой кишки и образуя биопленки, могут стать источником бактериального эндотоксина — ЛПС. При нарушении структуры эпителиального пласта происходит транслокация бактерий и их токсинов в лимфатическую и кровеносную системы. На проницаемость эпителиального кишечного барьера оказывают влияние различные факторы: состояние клеток в слизистой оболочке кишечника, окислительный стресс, клеточная гипоксия, увеличение кислотности и уровня провоспалительных цитокинов.

Регуляция проницаемости эпителия является ключевым звеном в осуществлении избирательного транспорта ионов, веществ и воды в различных органах. Открытие белков, формирующих плотные контакты (апикальные межклеточные структуры, обеспечивающие развитие эпителиального транспортного фенотипа и создающие барьер для движения ионов и веществ по межклеточному пути), поставило задачу по изучению механизмов регуляции парацеллюлярного транспорта. Обнаружено, что избирательная проницаемость эпителия напрямую зависит от молекулярного состава плотных контактов эпителия [8]. К основным белкам плотных контактов относятся: окклюдин [10], клаудины [11]. По своим эффектам эти белки можно подразделить на две группы. Так, клаудины 2, 7, 12, 15, 16 формируют селективные ионные поры [6]. В свою очередь, клаудины 1, 3, 4, 5, 8, 14,

18, 19 снижают проницаемость эпителия [7]. Особенно важным является факт взаимодействия этих белков с различными веществами, включая бактериальные токсины, которые вызывают изменение количественного и качественного представительства этих белков в плотных контактах, а также их локализацию [9, 13]. Действие токсинов бактериального происхождения на молекулярный состав плотных контактов эпителия кишки свидетельствует о том, что компоненты химуса могут быть источником соединений, регулирующих проницаемость эпителия. При этом показано, что термолабильные энтеротоксины кишечных палочек и других условно патогенных энтеробактерий, вызывая увеличение проницаемости слизистых оболочек кишечника, стимулируют скачкообразное сокращение и обильную секрецию. К таким токсинам относятся холерный токсин и ЛПС.

Холерный токсин представляет собой аргинин-специфическую АДФ-рибозилтрансферазу, которая, рибозилируя регуляторную субъединицу аденилатциклазы, вызывает ее устойчивую активацию в энтероцитах, что в конечном итоге приводит к открытию хлорных каналов на апикальной поверхности клетки. Хлор выходит из клетки, а по межклеточному пространству в просвет кишки перемещаются ионы натрия и вода.

ЛПС постоянно образуется в просвете ЖКТ при естественной гибели грамотрицательных бактерий и может оказывать токсическое действие на макроорганизм, например, индуцируя синтез повреждающих цитокинов и других медиаторов воспаления [1]. Следует отметить, что до сих пор остается невыясненной роль ЛПС в изменении структуры плотных контактов и их участие в транслокации бактерий — комменсалов через эпителий тонкой кишки. В процессе исследования роли тканевых барьеров при нормальном функционировании кишечника и при различных патологиях (например, при действии различных токсинов и ЛПС в значительных концентрациях) необходимо оценивать барьерные свойства эпителия, а также анализировать вклад белков плотных контактов в этот процесс. Участие ЛПС в транслокации бактерий из просвета кишечника в лимфу и системный кровоток в контексте изменения барьерных свойств эпителиоцитов на электронно-микроскопическом уровне до настоящего времени не рассматривалось. Для того, чтобы выяснить, каким образом условно патогенные энтеробактерии и холерные вибрионы, а именно их ЛПС и холерный токсин, влияют на эпителий тощей кишки и структуру плотных контактов, а также сравнить действие двух различных токсинов, в настоящей работе использовали трансмиссионную электронную микроскопию.

Цель настоящей работы — сравнительный электронно-микроскопический анализ плотных контактов и ультраструктурных изменений энтероцитов тощей кишки крыс при действии ЛПС и холерного токсина.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали липополисахариды из *Escherichia coli* O111:B4 производства Sigma-Aldrich (Германия) и холероген из *Vibrio cholerae* производства Sigma-Aldrich (Германия). Исследование проводили на крысах линии Wistar.

Опыты проводили на самцах крыс линии Wistar (n=12) массой 250 — 300 г. Все процедуры с крысами проводили в соответствии с правилами работы с экспериментальными животными. После умерщвления у животных продольно рассекали кожу на вентральной поверхности туловища, после этого делали разрез мышц по белой линии, проводили препарирование ЖКТ и выводили петли тощей кишки наружу. Выведенную петлю с двух сторон перевязывали лигатурами для введения исследуемых веществ в выделенный сегмент. В контрольной группе в полость кишки вводили физиологический раствор, в опытных группах крысам вводили ЛПС (20 мкг/мл) и холерный токсин (1 мкг/мл). Через 2 часа инкубации сегмент тощей кишки с исследуемым веществом отделяли и помещали в фиксатор для

электронно-микроскопического исследования. Для получения ультратонких срезов ткань фиксировали 2,5% раствором глутаральдегида в растворе Хенкса (рН=7,0) в течение 2 ч при температуре 4°C. Затем отмытые раствором Хенкса пробы подвергали вторичной фиксации 1% раствором четырехоксида осмия (OsO<sub>4</sub>) на основе того же раствора Хенкса в течение 2 ч при температуре 4°C. Фиксированные OsO<sub>4</sub> клетки после отмывки раствором Хенкса помещали в 2% раствор уранилацетата на ацетатном буфере (рН=5,2) при 40°C на 1 час. Отмытые ацетатным буфером препараты обезвоживали в серии этилового спирта возрастающей концентрации, в смеси спирта и ацетона и в ацетоне. Затем их заливали в смолу Spurr. Срезы готовили на ультратоме LKB-8800 (Швеция). Окраску срезов проводили по методу Reynolds уранилацетатом и цитратом свинца. Препараты просматривали в трансмиссионном электронном микроскопе JEM-100С (Япония) [3].

## РЕЗУЛЬТАТЫ

На ультратонких срезах эпителиоциты тощей кишки контрольной ткани имели характерную цилиндрическую форму с гликокаликсом и микроворсинками на апикальной мембране (рис. 1). В цитоплазме клеток обнаруживали митохондрии, на апикальной поверхности клеток расположены микроворсинки и комплекс плотных контактов

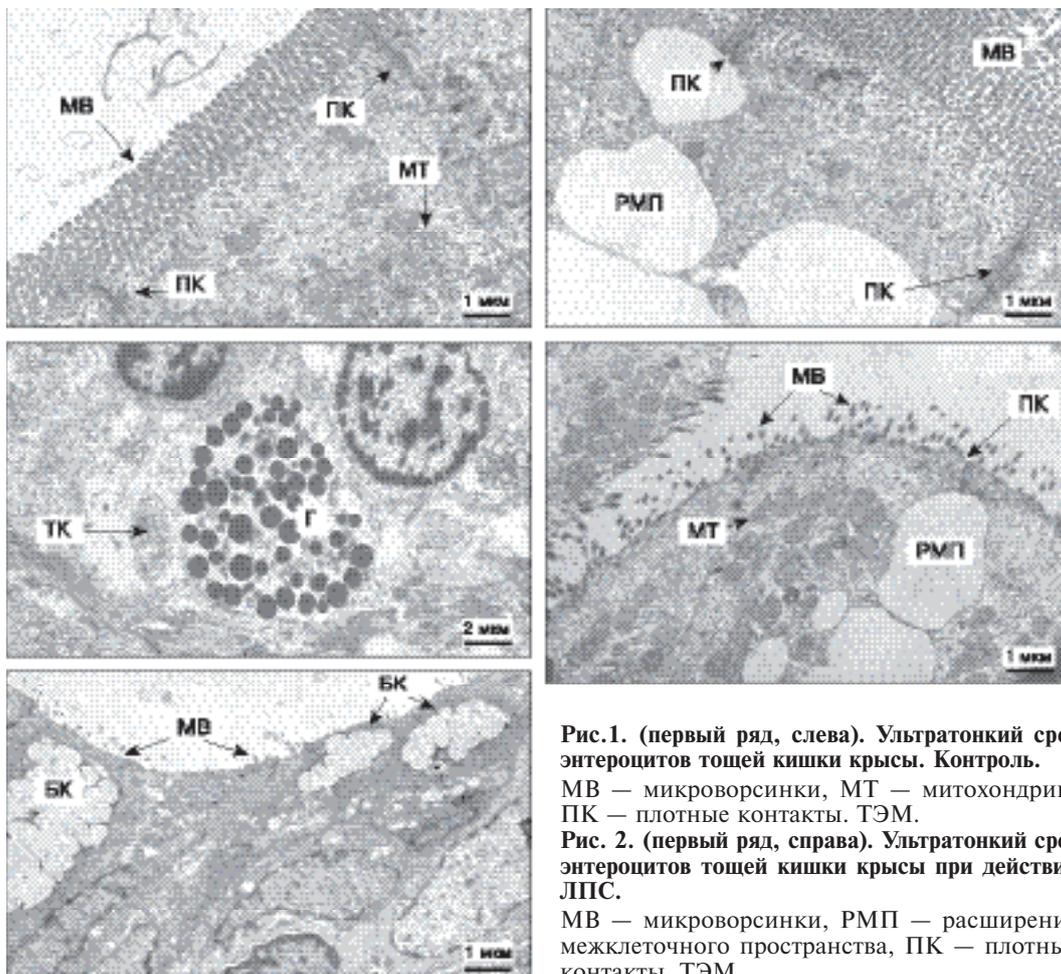
Воздействие ЛПС на клетки слизистой оболочки тощей кишки крыс приводило к значительному увеличению межклеточного пространства по сравнению с контролем, при этом деструкции плотных контактов не наблюдали (рис. 2). На электронограммах большей части клеток в области плотных контактов отсутствовали десмосомы. В отдельных клетках существенно увеличивалось ядро и зона, занимаемая ЭПС, при этом возрастало число митохондрий. При воздействии ЛПС в зоне, приближенной к апикальной части слизистой оболочки, отмечали появление тучных клеток, заполненных гранулами (рис. 3).

На электронно-микроскопическом уровне при действии холерного токсина на клетки слизистой оболочки тощей кишки наблюдали расширение межклеточного пространства по сравнению с контролем (рис. 4). Структура плотных контактов в этих клетках оставалась без изменений. При этом в клетках слизистой оболочки тощей кишки отмечали значительное увеличение числа митохондрий. На апикальной поверхности клеток выявлено снижение числа микроворсинок, а в латеральной области эпителиоцитов — исчезновение характерной складчатости плазматической мембраны.

При действии холерного токсина отмечено появление большого числа бокаловидных клеток (рис. 5).

## ОБСУЖДЕНИЕ

Повышенная проницаемость слизистых оболочек кишечника является основным фактором риска при распространении бактерий транслокационным путем [1]. Эпителий, являясь важным элементом тканевых барьеров, обеспечивает избирательный транспорт для передвижения ионов и макромолекул, а также создает препятствие для их проникновения в подлежащие ткани. Контроль за проницаемостью эпителиального слоя осуществляет апикальный межклеточный комплекс — плотные контакты, в состав которого входят белки семейства клаудинов. Холерный токсин может изменять проницаемость плотных контактов, и в модельных опытах подтверждено, что этот эффект опосредован изменением экспрессии белков клаудинов [5]. Ранее установлено, что поликатионное соединение протамин при действии с апикальной стороны эпителиоцитов меняет их межклеточную проницаемость и ультраструктуру плотных контактов [4]. Полученные данные позволяют предположить, что при действии



**Рис.1.** (первый ряд, слева). Ультратонкий срез энтероцитов тощей кишки крысы. Контроль. МВ — микроворсинки, МТ — митохондрии, ПК — плотные контакты. ТЭМ.

**Рис. 2.** (первый ряд, справа). Ультратонкий срез энтероцитов тощей кишки крысы при действии ЛПС. МВ — микроворсинки, РМП — расширение межклеточного пространства, ПК — плотные контакты. ТЭМ.

**Рис. 3.** (второй ряд, слева), Ультратонкий срез фрагмента тучной клетки тощей кишки крысы при действии ЛПС.

ТК — тучная клетка, Г — гранулы. ТЭМ.

**Рис. 4.** (второй ряд, справа), Ультратонкий срез энтероцитов тощей кишки крысы при действии холерного токсина.

МВ — микроворсинки, МТ — митохондрии, РМП — расширение межклеточного пространства, ПК — плотные контакты. ТЭМ.

**Рис. 5.** (слева, третий сверху). Ультратонкий срез бокаловидной клетки тощей кишки крысы при действии холерного токсина.

МВ — микроворсинки, БК — бокаловидные клетки. ТЭМ.

ЛПС барьерные свойства эпителия тонкой кишки крысы также способны к изменению. Кроме того, известно о негативном воздействии собственной дисбиотической микробиоты кишечника, при массивном росте которой формируется новый ассоциативный патомикробиоценоз, в дальнейшем становящийся источником эндогенной инфекции. Увеличение численности грамотрицательных бактерий в кишечнике, как правило, сопровождается наводнением кровотока ЛПС, который рассматривается, в первую очередь, как иммуномодулирующий фактор патогенности [2].

Для оценки роли эпителия при контакте с эндотоксином и было проведено сравнительное электронно-микроскопическое исследование плотных контактов при действии ЛПС и холерогена. Анализ ультратонких срезов показал, что дейст-

вие ЛПС и холерного токсина на плотные контакты и структуру эпителиоцитов тощей кишки не было полностью идентичным, несмотря на значительную общность ответных реакций.

По данным электронной микроскопии в обоих случаях отмечали резкое увеличение размеров межклеточного пространства на фоне отсутствия деструктивных изменений в области плотных контактов, при этом обращала на себя внимание слабо развитая система десмосом. Следует отметить, что в отдельных клетках наблюдали увеличение ядер и более выраженное развитие ЭПС как при действии ЛПС, так и при контакте с холерогеном.

К особому влиянию ЛПС следует отнести увеличение численности тучных клеток, значительную роль в дегрануляции которых играет цАМФ. Известно, что на многие воздействия, в том числе на микробные токсины и фрагменты клеток бактерий, тучные клетки отвечают стереотипной реакцией — увеличением количества клеток и выбросом медиаторов из гранул [12]. К особенностям воздействия холерогена на эпителиоциты слизистой оболочки тощей кишки можно отнести исчезновение складчатости латеральной области плазматической мембраны клеток и сокращение числа микроворсинок. Особое влияние холерогена следует отметить на бокаловидные клетки слизистой оболочки кишки, численность которых при его воздействии значительно увеличивалась.

Таким образом, сравнительный электронно-микроскопический анализ клеток и области плотных контактов эпителия тощей кишки крыс после воздействия ЛПС и холерного токсина выявил изменения в ультраструктуре энтероцитов при отсутствии деструкции плотных контактов. Однако действие исследуемых веществ нельзя считать полностью идентичным, несмотря на одинаковый ответ эпителиоцитов в виде расширения межклеточного пространства и практически полную сохранность целостности плотных контактов. Дальнейшее исследование проницаемости слизистых оболочек тонкой кишки при воздействии таких токсических метаболитов, как ЛПС и холерный токсин, наряду с оценкой ультратонкого строения эпителиоцитов требует комплексного анализа плотных контактов с использованием молекулярно-генетических методов. Решение вышеизложенных задач поможет ответить на основной вопрос: может ли при воздействии ЛПС меняться проницаемость эпителия в сторону усиления транслокации микроорганизмов.

По-видимому, именно сочетание молекулярно-генетических исследований с анализом барьерных свойств эпителия, в том числе на электронно-микроскопическом уровне, помогут прояснить, каким образом происходит инфицирование макроорганизма представителями, скорее всего, дисбиотной нормальной микрофлоры кишечника и какие факторы способствуют скорейшей транслокации бактерий в лимфу и системный кровоток.

*Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 15-04-074-64.*

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Бондаренко В.М., Рябиченко Е.В. Роль транслокации кишечной бактериальной аутофлоры и ее токсических биомолекул в патологии человека. Эксперим. клин. гастроэнтерол. 2007, 5: 86-93.
2. Бондаренко В.М., Лиходед В.Г. Диагностика, лечение и профилактика эндотоксинемии. Лечение и профилактика. 2012, 2 (3): 70-76.
3. Рыбальченко О.В. Электронно-микроскопическое исследование межклеточных взаимодействий микроорганизмов при антагонистическом характере взаимоотношений. Микробиология. 2006, 75 (4): 550-555.
4. Рыбальченко О.В., Бондаренко В.М., Фальчук Е.Л., Лебедькова Ю.А., Марков А.Г. Действие холерогена и протамина на плотные контакты энтероцитов и колоноцитов крыс. Журн. микробиол. 2012, 6: 3-7.

5. Alzamora R., O'Mahony F., Harvey B.J. Estrogen inhibits chloride secretion caused by cholera and Escherichia coli enterotoxins in female rat distal colon. *Steroids*. 2011, 76: 867-876.
6. Amasheh S., Meiri N., Gitter A.H. et al. Claudin-2 expression induces cation-selective channels in tight junctions of epithelial cells. *J. Cell Sci.* 2002, 115: 4969-4976.
7. Amasheh M., Schlichter S., Amasheh S. Quercetin enhances epithelial barrier function and increases claudin-4 expression in Caco-2 cells. *J. Nutr.* 2008, 138 (6): 1067-1073.
8. Angelow S., Yu A. S. Claudins and paracellular transport: an update. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* 2007, 16 (5): 459-464.
9. Berkes J., Viswanathan V. K., Savkovic S. D., Hecht G. Intestinal epithelial responses to enteric pathogens: effects on the tight junction barrier, ion transport, and inflammation. *Gut*. 2003, 52 (3): 439-451.
10. Furuse M., Hirase T., Itoh M. et al. Occludin: a novel integral membrane protein localizing at tight junctions. *J. Cell Biol.* 1993, 123 (6, pt 2): 1777-1788.
11. Furuse M., Fujita K., Hiiragi T. et al. Claudin-1 and -2: novel integral membrane proteins localizing at tight junctions with no sequence similarity to occludin. *J. Cell Biol.* 1998, 141 (7): 1539-1550.
12. He S.H. Key role of mast cells and their major secretory products in inflammatory bowel disease. *World J. Gastroenterol.* 2004, 10 (3): 309-318.
13. Katahira J., Inoue N., Horiguchi Y. et al. Molecular cloning and functional characterization of the receptor for Clostridium perfringens enterotoxin. *J. Cell Biol.* 1997, 136 (6): 1239-1247.
14. Sack D.A., Sack R.B., Nair G.B., Siddique A.K. Cholera. *Lancet*. 2004, 363 (9404): 223-233.

*Поступила 10.05.15*

Контактная информация: Рыбальченко Оксана Владимировна, д.б.н., проф.,  
199106, С.-Петербург, ВО, 21 линия, 8а

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2016

*В.П.Терлецкий<sup>1,2</sup>, В.И.Тыщенко<sup>1,2</sup>, О.Б.Новикова<sup>2</sup>, И.И.Новикова<sup>3</sup>, Э.Д.Джавадов<sup>2</sup>*

## **НОВЫЙ ПОДХОД К ГЕНОТИПИРОВАНИЮ ГОСПИТАЛЬНЫХ ИЗОЛЯТОВ CLOSTRIDIUM DIFFICILE**

<sup>1</sup>Всероссийский НИИ генетики и разведения сельскохозяйственных животных, Санкт-Петербург-Пушкин; <sup>2</sup>Всероссийский научно-исследовательский ветеринарный институт птицеводства, Санкт-Петербург-Ломоносов; <sup>3</sup>Всероссийский НИИ защиты растений, Санкт-Петербург-Пушкин

*Цель.* Разработка нового подхода в генотипировании Clostridium difficile и испытание его на примере 140 госпитальных изолятов. *Материалы и методы.* Подход основан на идее двойного расщепления и избирательного мечения (ДРИМ), использованного ранее при генотипировании других бактериальных патогенов. Был осуществлен подбор оптимальных ферментов рестрикции MluI и Mph1103I, оптимизированы условия проведения реакции ДРИМ. *Результаты.* Проведено генотипирование госпитальных изолятов C.difficile, рассчитан индекс дискриминации штаммов, сделаны выводы о возможностях метода в выяснении путей распространения и идентификации источников инфекции. *Заключение.* Разработанный метод генотипирования имеет ряд преимуществ над существующими методами и может применяться в решении вопросов эпидемиологии инфекций, вызванных C.difficile.

Журн. микробиол., 2016, № 2, С. 9—15

Ключевые слова: геномная ДНК, бактерии, Clostridium difficile, генотипирование, молекулярная эпидемиология, ферменты рестрикции