

МИНОБРНАУКИ РОССИИ
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования
**«САРАТОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н.Г. ЧЕРНЫШЕВСКОГО»**

Кафедра биохимии и биофизики

ПРИМЕНЕНИЕ ЭЛЕКТРООПТИЧЕСКОГО МОНИТОРИНГА ДЛЯ
АНАЛИЗА ФИЗИОЛОГИЧЕСКОГО СОСТОЯНИЯ БАКТЕРИАЛЬНЫХ
КЛЕТОК *FRANCISELLA TULARENSIS*

АВТОРЕФЕРАТ МАГИСТЕРСКОЙ РАБОТЫ

Студентки 2 курса 241 группы

Направления подготовки 06.04.01 Биология

Биологического факультета

Борисовой Светланы Владимировны

Научный руководитель
Доцент, к.б.н.


подпись, дата
03.06.2019.

М.В. Каневский

Научный консультант
Зав. отделом профилактических препаратов
ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб», к.б.н.,


подпись, дата

О.А. Волох

Зав. кафедрой биохимии и
биофизики, д.б.н., профессор


подпись, дата
03.06.2019

С.А. Коннова

Саратов 2019

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность работы. Туляремия – природно-очаговое зоонозное инфекционное заболевание бактериальной этиологии, характеризующееся общей интоксикацией, поражением лимфатических узлов, дыхательных путей, пищеварительного тракта, наружных покровов и других органов и систем [1].

Ежегодно в России регистрируется от 100 до 400 случаев заболевания туляремией, 75% из них приходится на Северный, Центральный и Западно-Сибирский регионы страны. Особенностью современной заболеваемости туляремией является то, что более 70% заболевших составляют не привитые против этой инфекции городские жители. За последние десять лет вспышки туляремии были зарегистрированы в Республике Башкортостан, Дагестане, Смоленской и Оренбургской областях, г. Москве.

Статистически регистрируемая заболеваемость по России относительно невелика, однако, ее уровень не соответствует истинной частоте туляремии, которая значительно выше. Доказательством этого является большое количество здоровых людей с положительными результатами серологических и кожных проб на туляремию, без установленного диагноза в анамнезе, особенно среди сельского населения. Это явление объясняется тем, что данное заболевание протекает в виде легких случаев ангины, бронхита, гнойной раны, лимфаденита, панариция. Так же, в последнее время, увеличилось число больных туляремией и среди городских жителей. Это связано с ростом интереса городского населения к работе на земельных участках и интенсификации «дикого» туризма.

Вакцинопрофилактика является самым надежным способом профилактики туляремии. В настоящее время в РФ для специфической профилактики применяют туляремийную живую сухую вакцину. Туляремийная живая сухая вакцина в 2011 году Приказом Министерства здравоохранения и социального развития РФ (№ 51н от 31 января 2011 г.) включена в Национальный календарь профилактических прививок по

эпидемическим показаниям. Ежегодно в России вакцинируют и ревакцинируют около 1 млн человек [2].

Основным компонентом вакцины являются клетки вакцинного штамма *Francisella tularensis* 15 линии НИИЭГ. Производство вакцины представляет собой сложный многоступенчатый процесс, основные этапы которого – получение жизнеспособных иммуногенных бактерий вакцинного штамма и приготовление из них готовой лекарственной формы – лиофилизата. Постоянно совершенствуются и создаются новые методы производства, контроля и диагностики препаратов. Для реализации оптимального выхода бактериальной биомассы необходим комплексный контроль ферментации и качества получаемой бактериальной культуры.

Качество препарата на стадиях его производства контролируется в соответствии с нормативной документацией, используются стандартные микробиологические и биологические методы. Но длительное время получения результата анализа, а также невозможность контролировать состояние бактериальной клетки, является существенным недостатком для данных методов.

В связи с этим внедрение новых инструментальных методов контроля, позволяющих оценивать основные параметры и физиологическое состояние бактериальной клетки, является перспективным направлением исследований.

Очень важно получить максимально полную информацию о состоянии бактериальной клетки, совокупность ее физиологических, биохимических и физических параметров, так как все эти параметры тесно взаимосвязаны и изменяются в процессе взаимодействия клетки с окружающей средой. Информация о биохимических процессах в культуре, о ее росте и отмирании – ключевая для исследования оптимизации процессов роста биомассы.

Одним из новейших методов оценивания параметров развития культуры является электрооптический мониторинг. Его применение обладает рядом преимуществ. Использование электрооптического мониторинга позволяет производить измерения в режиме реального времени без специальной

пробоподготовки. Воздействие на клетки во время процедуры минимально и не приводит к их гибели, а влияние поддерживающей среды на точность измерения незначительна.

Исходя из вышесказанного **цель** данной работы заключалась в оценке применения электрооптического мониторинга для оценки физиологического состояния клеток *Francisella tularensis*.

Для реализации поставленной цели в ходе исследования были поставлены и решались следующие **задачи**:

1. Исследовать динамику изменения поляризуемости клеток *F. tularensis*, выращенных в условиях перекисного и температурного стресса в различных питательных средах

2. Изучить влияние антибиотиков в среде выращивания на изменение электрических показателей клеток *F. tularensis*

3. Оценить жизненные показатели клеток *F. tularensis* при выращивании их в присутствии дезинфицирующих средств.

Структура бакалаврской работы. Выпускная квалификационная работа состоит из пяти частей: введения, основной части, заключения, выводов и списка использованных источников. Основная часть включает в себя три раздела: обзор литературы, материалы и методы исследования, результаты исследований. Раздел обзор литературы состоит из шести подразделов: актуальность применения электрофизических методов, электрооптический эффект как способ изучения клеток, метод электроротации, электрооптический анализ, *F. tularensis* 15 НИИЭГ как объект исследования, особенности строения мембраны и цитоплазмы у *Francisella tularensis*. Раздел материалы и методы состоит из шести подразделов: приборы и материалы, объект исследования, условия культивирования микроорганизмов, метод электрооптического анализа, метод атомно-силовой микроскопии, метод иммуноблоттинга.

Раздел результаты исследований включает в себя три подраздела: исследование изменения поляризуемости клеток туляремии, выращенных в

условиях перекисного и температурного стресса в различных питательных средах, изучение динамики влияния антибиотиков в среде выращивания на изменение электрических показателей клеток туляремии, оценка жизненных показателей клеток *F. tularensis* при выращивании их в присутствии дезинфицирующих средств.

Приборы и материалы

Культивирование микроорганизмов проводили при постоянном перемешивании на орбитальном шейкере BioSan Ltd “PSU-10” (Латвия).

Электрооптические свойства клеток изучали при помощи установки непрерывного электрооптического мониторинга EloTrace 3.0 (EloSystems, Германия). Прибор предназначен для измерения анизотропии поляризуемости в диапазоне частот 400 мГц — 4 ГГц. Обработку и анализ полученных данных проводили с использованием программы ElusPro.

Исследования морфологии клеток проводили с помощью сканирующего зондового микроскопа SolverP47-PRO (Россия) методом полуконтактной атомно-силовой микроскопии в воздушной среде. Обработку и анализ изображений проводили с использованием программы ImageAnalysis.

Жизнеспособность культуры так же оценивали высевом на пластинки с FT агаром, учитывали колониобразующие единицы (КОЕ).

Статистическая обработка фактического материала выполнена на ПЭВМ, с применением программы Microsoft Exsel 7.0, достоверность различий между средними значениями в контрольной и опытной группах устанавливали с помощью t- критерия Стьюдента.

Объект исследования

Штамм *Francisella tularensis* 15 НИИЭГ получен из «Государственной коллекции патогенных бактерий «Микроб». Данный штамм получают путем десятикратного пассажа через организм морской свинки. Он авирулентен для

человека, но вызывает заражение у мышей. На его основе на данный момент и производится туляремийная вакцина.

Метод электрооптического мониторинга

Оценку состояния клеток проводили методом электрооптического мониторинга [25]. Суспензия клеток вносится в измерительную кювету, которая находится под воздействием переменного электромагнитного поля. Объемный механизм поляризуемости характеризуется появлением индуцированных зарядов на границах раздела сред с различными комплексными диэлектрическими проницаемостями. Величина индуцированных на границах раздела зарядов пропорциональна напряженности электрического поля и зависит от соотношения комплексных диэлектрических проницаемостей структур. Для живой клетки, в том числе бактериальной, такими границами раздела являются поверхности соприкосновения цитоплазматической мембраны с внешней средой, а также мембраны с цитоплазмой. Основным измеряемым параметром является анизотропия поляризуемости (АП), измеряемая в условных единицах.

Метод атомно-силовой микроскопии

Изучение размеров клеток и их поверхностных характеристик проводилось с помощью атомно-силового микроскопа. Принцип его работы основан на регистрации силового взаимодействия между специальным зондом – кантилевером и образцом. Под силовыми взаимодействиями подразумевают дальнодействующие силы Ван-дер-Ваальса, которые сначала являются силами притяжения, а при дальнейшем сближении переходят в силы отталкивания. Сила, действующая на зонд со стороны поверхности, приводит к изгибу консоли. Появление возвышенностей или впадин под остриём приводит к изменению силы, действующей на зонд, а значит, и изменению величины изгиба кантилевера. Таким образом, регистрируя величину изгиба, можно сделать вывод о рельефе поверхности [72].

Пробоподготовка образцов для атомно-силовой микроскопии проводилась путем нанесения на покровное стекло образца с добавлением 70% спиртового раствора и дальнейшим высушиванием на открытом воздухе.

Метод иммуноблоттинга

Для определения полученных стресс-белков, был использован метод иммуноблоттинга. Данный метод основан на переносе белков с полиакриламидного геля на нитроцеллюлозную мембрану и их дальнейшей детекции с помощью специфичных антител [8]. В данной работе в качестве детектора использовалась сыворотка белой мыши, иммунизированной клетками *F. tularensis* 15 НИИЭГ.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Экспериментальные исследования проводились на базе лаборатории холерных вакцин отдела профилактических препаратов ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб», в период с 2017 по 2019 год.

Постановка эксперимента. Культивирование бактерий *F. tularensis* subsp. *holarctica* 15 НИИЭГ производили на агаре FT (пр-ва ГНЦ ПМБ Оболенск) при 37 °С в течении 24 ч. Затем бактерии инокулировали в жидкую среду Чемберлена рН6,2, бульон Мюллера-Хинтона рН7,4 и Т-бульон с добавкой солей и глюкозы рН 7,2, Д-бульон рН 7,2 [6] и культивировали в колбах Эрленмейера (объем колб 250 мл, объем среды 25 мл) на термостатируемой качалке (InforsMINITRONII, ДиаэМ) 200 об./мин. в течение 16 часов при (37±2) °С до достижения OD₆₀₀= 0,5-0,6 (экспоненциальная фаза роста), после чего вносили стресс-условия.

В качестве стресс-условий были выбраны:

- а) Температурный стресс – 42°С
- б) Перекисный стресс – добавление в среду выращивания H₂O₂ до концентрации 5мМоль/л

в) Антибиотики – стрептомицин, канамицин, ампициллин, которые растворяли в дистиллированной воде и добавляли в среду выращивания после внесения инокулята до концентрации 0,5 г/л.

г) Дезинфицирующие растворы – мертиолят натрия, фенол, хлорамин – добавляли до определенной концентрации в культуральную жидкость.

Обсуждение результатов исследования.

Исследование изменения поляризуемости клеток туляремийного микроба, выращенных в условиях перекисного и температурного стресса в различных питательных средах

На первом этапе работы проводились исследования по изучению влияния различных сред культивирования на ЭО свойства клеточной суспензии *F. tularensis*. Необходимо было установить, какая из выбранных нами сред больше всего подходит для культивирования данного штамма. Так же, в наши задачи входило изучение выделения стрессовых белков в различных питательных средах при стресс-условиях.

В эксперименте использовались четыре питательных среды: среда Чемберлена, бульон Мюллера-Хинтона, Т-бульон и Д-бульон. Выбор данных сред обусловлен их различающимся составом и направлением использования.

В ходе эксперимента было показано, что выращивание *F. tularensis* в стрессовых условиях приводит к изменению электрооптического (ЭО) эффекта в разных средах, что свидетельствует об изменении ориентационного спектра клеток. Во всех питательных средах, в той или иной степени, наблюдалось снижение жизнеспособности клеток с ухудшением условий. Наименьшая разница между контролем и опытом наблюдалась в Т-бульоне. Так как данная среда является сложной и специализированной для выращивания туляремии, можно сказать, что воздействие стресс-условий было нивелировано составными элементами данной питательной среды.

Если сравнивать только контрольные показатели в разных средах, то можно наблюдать максимальную анизотропию в среде Мюллера-Хинтона с

T-добавкой. Тут жизнеспособность клеток максимальна относительно других сред. Это говорит о том, что состав данной питательной среды наиболее оптимален для выращивания микробной биомассы. Тем не менее, стрессовые условия снижают жизнеспособность в данной среде на 30%, что гораздо больше, чем в остальных средах.

Было исследовано изменение размеров клеток и показателей поверхности клетки - ригидности и шероховатости клеточной стенки в зависимости от использования различных сред и стрессовых условий. Данные изменения оценивались с помощью атомно-силового микроскопа. Было показано, что в Д-бульоне и среде Чемберлена повышение температуры приводило к увеличению среднего размера клеток на $6\pm 1\%$. В Д-бульоне комбинация повышенной температуры и добавления перекиси водорода так же приводило к увеличению размера клеток, но уже на 10%. Это связано с тем, что происходит усиление синтеза капсульного вещества.

В ходе проведения эксперимента было установлено, что ЭО эффект при воздействии высокой температуры и перекиси водорода уменьшается, в сравнении с результатом, полученным при воздействии только температуры, а так же с контролем, но приводит к усилению синтеза стрессовых белков. Наибольший синтез стресс-белков наблюдался при выращивании в среде Мюллера-Хинтона.

ЭО мониторинг показал, что наиболее благоприятной средой для выращивания туляремийного микроба является бульонная среда Мюллера-Хинтона, на которой был зарегистрирован максимальный синтез экскретируемых белков. Стресс-условия (42°C , H_2O_2) незначительно снижали жизнеспособность *F. tularensis* но приводили к значительному увеличению экспрессии белков теплового шока, что согласуется с литературными данными.

Изучение динамики влияния антибиотиков в среде выращивания на изменение электрических показателей клеток *F. tularensis*

Антибиотикотерапия является основным методом лечения туляремии. Основными антибактериальными препаратами против данного заболевания являются антибиотики группы аминогликозидов. В данном эксперименте были взяты основные представители данных групп антибиотиков – стрептомицин и канамицин. Так же был взят ампициллин, как представитель группы пенициллинов.

Наибольшим повреждающим действием на клеточную стенку и мембрану в данной концентрации обладает ампициллин. Уже в первые минуты нахождения данного антибиотика в среде культивирования ЭОЭ снижается больше, чем в два раза, по сравнению с контролем. Данные результаты можно объяснить тем, что в силу гидрофобности ампициллин активно сорбируется на мембране. Через 15 минут сопротивляемость клетки резко возрастает. Это можно объяснить тем, что присутствие в среде выращивания антибиотиков стимулирует клетку к стабилизации мембраны, чтобы предотвратить их проникновение внутрь. На последующих временных отрезках снова наблюдается снижение сопротивляемости клетки, и, в случае с ампициллином достигает своего минимума. Это говорит о снижении жизнеспособности клеток, которое связано с нарушением целостности мембран. Воздействие стрептомицина так же имело аналогичные результаты, но менее выраженные.

Оценка жизненных показателей клеток *F. tularensis* при выращивании их в присутствии дезинфицирующих средств

Для эксперимента были взяты дезинфектанты, которые используются для обеззараживания одежды, рабочих инструментов и биологических жидкостей: 0.5% хлорамин, 1% мертиолят натрия и 5% раствор фенола.

Было показано, что активные изменения в ЭОЭ суспензии клеток *F. tularensis* наблюдаются при воздействии хлорамина и мертиолята натрия. Максимальное уменьшение электрооптического сигнала происходит при воздействии 0,5% хлорамина. При этом, чем дольше воздействие, тем

сильнее изменяется данный показатель. Уже через 45 минут жизнеспособность максимально снижена и соответствует показателям дезинфекции по СП.

Поскольку мертиолят используется как консервант в производстве туляремийной вакцины и обладает бактериостатическим действием, то он не оказывает такого сильного воздействия на культуру, как хлорамин. Тем не менее, по прошествии 45 минут жизнеспособность клеток снизилась на 40%. Максимально низкий ЭОЭ наблюдался при обеззараживании культуры по СП.

Фенол не входит в список дезинфектантов, предназначенных для обеззараживания микроорганизмов I и II групп патогенности. Данное вещество, так же, как и мертиолят натрия, применяется для консервации вакцин. На рисунке 9 видно, что ЭОЭ в течении 45 минут практически не изменяется.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Строение поверхности клетки отражает функциональное состояние бактерии в целом. Наличие специфических признаков клеток сказывается на биофизических характеристиках их поверхности: заряд, свободная энергия и гидрофобность. Взаимодействие бактерий с биомолекулами и частицами также связаны с этими характеристиками поверхности.

Электростатические силы взаимодействия определяются наличием на поверхности клеток заряженных групп белков, гликопептидов и других биомолекул. Подавляющее большинство бактерий при нейтральном pH заряжены отрицательно, но потенциал поверхности может в значительной мере меняться под влиянием внешних условий. Передвижение клеток в электрическом поле происходит в результате образования разности потенциалов между дисперсной фазой и дисперсионной средой, так называемого электрокинетического потенциала. Заряд на поверхности клеток образуется из-за адсорбции ионов раствора или из-за локализации диссоциирующих групп дисперсной фазы. В результате на поверхности клеток адсорбируется двойной электрический слой, строение которого зависит от концентрации ионов в среде. Таким образом, образование заряда на поверхности двух фаз обусловлено ассиметричным распределением ионов. Ионы одного знака прочно связаны с поверхностью частиц, а ионы противоположного знака находятся в дисперсной среде.

Проведенные исследования показали перспективность применения метода электрооптического мониторинга для изучения особенностей строения, физиологического состояния отдельной клетки на разных стадиях роста бактериальной популяции в целом, для определения взаимодействия микроорганизмов с биологически активными молекулами: антителами, антибиотиками, инактивирующими агентами. Разработка алгоритма проведения электрооптического мониторинга клеток штаммов-продуцентов вакцинных препаратов против опасных инфекционных заболеваний на

модели туляремиального микроба является перспективной задачей дальнейшего исследования в данном направлении.

Таким образом, условия культивирования *F. tularensis* влияют на жизненные показатели клеток и уровень экспрессии антигенов. Электрооптический анализ успешно регистрирует различные типы воздействия на клетки микроорганизма в режиме реального времени и является перспективным методом контроля при разработке профилактических и диагностических препаратов.

ВЫВОДЫ

1. Условия культивирования *F. tularensis* влияют на жизненные показатели клеток и уровень экспрессии антигенов. Наиболее благоприятной средой для проведения исследований стресс-факторов является бульон Мюллера-Хинтона, а наиболее показательной ЭО частотой - 900кГц. Электрооптический анализ функционального состояния микробных клеток в режиме реального времени является перспективным методом контроля при разработке профилактических и диагностических препаратов.

2. Культивирование *F. tularensis* в условиях перекисного и температурного стресса снижает жизнеспособность клеток, но увеличивает продукцию стресс-белков.

3. Под влиянием эффективной концентрации ампициллина наблюдалось изменение ЭОЭ, связанное с изменениями, происходящими в клеточной мембране.

4. Выращивание в присутствии дезинфицирующих средств показало, что изменения ЭОЭ клеток и, соответственно, снижение их жизнеспособности происходит практически сразу после контакта.

