

5. *Effect of deuterium oxide on leukotriene C4 generation in immunologically stimulated human leukocytes* / H. Mita, Y. Yui, H. Yasueda, I. Shida // *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.*—1988.—85, N 4.—P. 422—427.
6. *Lin P. C., Hepfter K., Ho K. C. Modification of membrane function, protein synthesis and heat killing effect in cultured chinese hamster cells by glycerol and D₂O* // *Cancer Res.*—1984.—44, N 12, pt 1.—P. 5776—5784.
7. *Leonard P. J., Millins J. M. D₂O induced alterations of mitosis in PtK1 cells* // *Exp. Cell Res.*—1987.—172, N 1.—P. 204—211.
8. *Фултон А. Цитоскелет. Архитектура и хореография клетки.*—М.: Мир, 1987.—120 с.
9. *Shelanski M., Gaskin F., Cantor Ch. F. Microtubule assembly in the absence of added nucleotides* // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—1973.—70, N 3.—P. 765—768.
10. *Microtubules in mouse embryo fibroblasts extracted with Triton X-100* / A. D. Bershadsky, V. I. Gelfand, T. M. Svitkina, I. S. Tint // *Cell Biol. Int. Rept.*—1978.—2.—P. 425—432.
11. *Greenberg Ch., Graddock Ph. Rapid single-step membrane protein assay* // *Clin. Chem.*—1982.—28, N 7.—P. 1725—1726.
12. *Сорочинский Б. В., Прохневский А. И., Гродзинский Д. М. Простой способ выделения физиологически активных препаратов таксола из тканей Taxus baccata* // *Химия природ. соединений.*—1990.—№ 5.—С. 702—703.
13. *Voter W. A., Ericson H. P. The kinetics of microtubule assembly* // *J. Biol. Chem.*—1984.—259, N 16.—P. 10430—10438.
14. *Прохневский А. И., Сорочинский Б. В. Модификация этанолом сборки микротрубочек мозга* // *Нейрохимия.*—1990.—9, № 1.—С. 96—100.

Ин-т клеточ. биологии и генет. инженерии АН УССР, Киев

Получено 20.11.90

УДК 577.3:576.5:577.352

**А. В. Тимошенко, Л. К. Герасимова, Л. И. Колупаева,
С. Н. Черенкевич**

МЕЖКЛЕТОЧНАЯ АГРЕГАЦИЯ ТИМОЦИТОВ И БАКТЕРИАЛЬНЫХ КЛЕТОК ESCHERICHIA COLI

С использованием спектрофотометрического метода установлено, что бактериальные клетки E. coli вызывают агрегацию тимоцитов крыс. Процесс межклеточной агрегации блокируется D-маннозой. Показано, что агрегационная активность бактериальных клеток снижается при их инактивации ультрафиолетовым (УФ) облучением и под действием высокой температуры (80 °С). Обсуждаются механизмы и возможности использования реакции межклеточной агрегации.

Введение. Проблема молекулярного узнавания поверхностных структур клеток микро- и макроорганизмов представляется актуальной для современной клеточной биологии. Бактериальные клетки способны эффективно прикрепляться к клеткам млекопитающих посредством адгезионных пилей (фимбрий), представляющих собой белковые структуры на поверхности микробных клеток [1, 2]. Эта реакция лежит в основе развития большинства бактериальных инфекций. Как правило, эффективность взаимодействия бактериальных клеток с клетками-мишенями оценивается по их адгезии на клеточных монослоях. Такой метод требует применения специальной техники, связанной с культивированием клеток [3]. Межклеточную адгезию можно изучать также с использованием более доступных и оперативных агрегационных методов [4]. В случаях, когда клетки млекопитающих не образуют монослоев, эти способы, по-видимому, являются наиболее адекватными, если не единственно возможными. Такая ситуация имеет место при изучении взаимодействия бактериальных клеток с Т-лимфоцитами, характеризующимися низкой адгезией к большинству подложек [5].

В настоящей работе исследована межклеточная агрегация тимоцитов крыс и бактериальных клеток *E. coli*, определена углеводная специфичность этой реакции и показано, что физико-химическая обра-

© А. В. ТИМОШЕНКО, Л. К. ГЕРАСИМОВА, Л. И. КОЛУПАЕВА, С. Н. ЧЕРЕНКЕВИЧ, 1991

ботка бактериальных клеток приводит к потере их агрегационных свойств.

Материалы и методы. В работе анализировали агрегацию лимфоидных клеток, выделенных из тимуса белых беспородных крыс по описанной ранее методике [4]. Тимоциты суспендировали в фосфатно-солевом буфере Дюльбекко, pH 7,3.

Бактериальные клетки *E. coli* 1157 культивировали по стандартным методикам [6]. Использовали 18-часовую культуру бактериальных клеток, выращенную на мясном питательном бульоне (СССР) при 37 °С. Клетки осаждали центрифугированием при 5000 g в течение

10 мин, промывали и суспендировали в буфере Дюльбекко. Для определения жизнеспособности клетки высевали на чашках Петри с мясо-пептонным агаром и подсчитывали число коло-

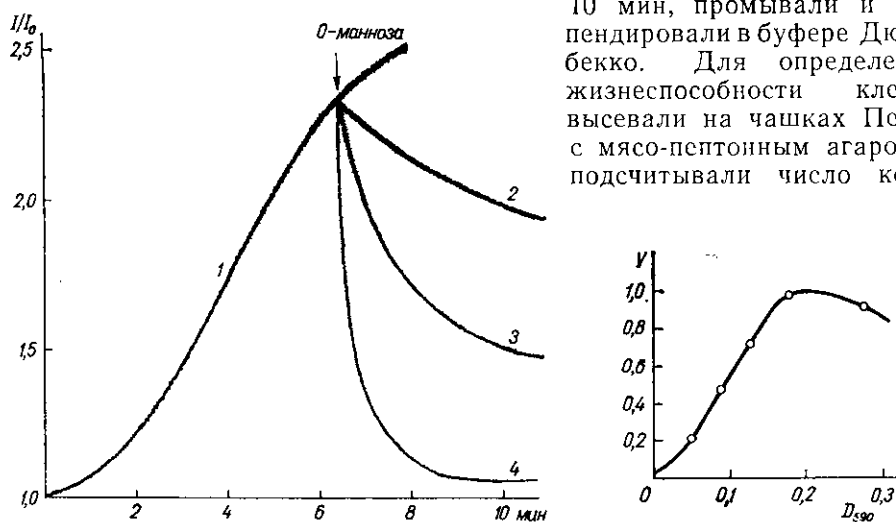


Рис. 1. Изменение величины светопропускания суспензии тимоцитов крыс после добавления *E. coli* (1) и *D*-маннозы к агрегированным клеткам (2—4). Концентрации: тимоцитов $7 \cdot 10^6$ кл/мл ($D_{590} = 0,95$); бактериальных клеток *E. coli* $1,5 \cdot 10^8$ кл/мл ($D_{590} = 0,15$); *D*-маннозы — 2 (2), 5 (3) и 50 мМ (4)

Рис. 2. Влияние бактериальных клеток *E. coli* на скорость межклеточной агрегации. По оси абсцисс — оптическая плотность суспензии *E. coli* при 590 нм, к которой добавляли тимоциты в концентрации $6,5 \cdot 10^6$ кл/мл ($D_{590} = 0,9$). По оси ординат — скорость межклеточной агрегации

нисообразующих единиц. Результаты каждой пробы оценивали при подсчете колоний на девяти чашках, пробы брали в двух повторах.

Межклеточную агрегацию тимоцитов крыс и бактериальных клеток *E. coli* исследовали с помощью специального агрегометра, изготовленного на базе калориметра КФК-2, по изменению величины светопропускания клеточных суспензий при 590 нм [7]. Оба типа клеток хранили при температуре тающего льда. Измерения проводили при комнатной температуре, клеточные суспензии постоянно перемешивали.

В качестве источника УФ-излучения применяли медицинский облучатель ОКУФ-5М. Суспензию бактериальных клеток в кварцевых кюветах облучали суммарным светом облучателя.

В работе использовали «Большой набор углеводов для исследования ферментации микробов кишечной группы» производства завода «Химреактивкомплект» (СССР), мальтотриозу фирмы «Sigma» (США) и *D*-маннозу производства Центра хим. исследований САН (ЧСФР).

Результаты и обсуждение. В результате проведенных исследований установлено, что при смешивании суспензий тимоцитов крыс и бактериальных клеток *E. coli* образуются межклеточные агрегаты, которые можно наблюдать под микроскопом. Величина светопропускания суммарной клеточной суспензии при этом увеличивается (рис. 1). Происходит типичная агрегация клеток, сходная с описанной ранее, например для лектин-индуцированной агрегации тимоцитов [4]. Отличие состоит лишь в том, что в качестве индуктора агрегации высту-

пают бактериальные клетки *E. coli*. Следует отметить, что реакция межклеточной агрегации происходит независимо от того, в какой последовательности добавляются клетки. Скорость ее существенно зависит от концентрации микробных клеток. С увеличением количества *E. coli* скорость агрегации тимоцитов растет (рис. 2). На основании этой зависимости можно выбрать наиболее оптимальные условия для изучения реакции межклеточной агрегации. Так, при концентрации тимоцитов крысы $7 \cdot 10^6$ кл/мл оптимальная концентрация клеток *E. coli* составляет приблизительно $1,5 \cdot 10^6$ кл/мл.

Из литературы известно, что адгезия микробных клеток на клетках млекопитающих происходит с участием специфических рецепторов клеток, содержащих углеводные остатки [1]. Со стороны микробных клеток в этом процессе участвуют адгезионные пили белковой природы. Другими словами можно сказать, что молекулярное узнавание клетками друг друга основывается на углевод-белковом взаимодействии. В этих процессах принимают участие особые белки — лектины, специфически взаимодействующие с углеводами и гликопротеинами [2]. Для определения углеводной специфичности реакции межклеточной агрегации тимоцитов и бактериальных клеток *E. coli* изучено влияние простых углеводов на процесс дезагрегации клеток. Для этого использован «Большой набор углеводов для исследования ферментации микробных клеток кишечной группы» (D-мальтоза, D-лактоза, D-галактоза, D-сахароза, D-глюкоза, L-рамноза, D-сорбит и дульцит), а также мальтоза и D-манноза. Оказалось, что единственным углеводом, который вызывал дезагрегацию клеток, была D-манноза. Дезагрегирующее действие D-маннозы зависит от ее концентрации (рис. 1), при этом полная и быстрая дезагрегация наблюдается при концентрации D-маннозы, равной 50 мМ.

Полученные данные свидетельствуют о высокой углеводной специфичности реакции межклеточной агрегации тимоцитов и бактериальных клеток *E. coli*. Следует отметить, что аналогичное блокирующее действие D-манноза оказывает на прикрепление клеток *E. coli* к эпителиальным клеткам [1], перитонеальным макрофагам крысы и полиморфонуклеарным гранулоцитам человека [8]. Это означает, что D-манноза входит в состав рецепторных структур клеток, участвующих в процессе молекулярного узнавания клетками друг друга. Показано, что остатки D-маннозы входят в состав рецепторов эпителиальных клеток, взаимодействующих с бактериальными адгезионными пилиями [1]. В случае тимоцитов крысы это могут быть лектиновые рецепторы клеток, в частности рецепторы клеток для КоНА, который является маннозоспецифичным лектином и вызывает эффективную агрегацию тимоцитов [4]. Отметим, однако, что антиадгезивное и антиагрегационное действие D-маннозы наблюдается, хотя и часто, но не во всех случаях [1, 2]. В соответствии с этим различают два типа адгезионных пилей на поверхности микробных клеток: маннозочувствительные и маннозорезистентные [8]. Соответствующие белки (адгезины), входящие в состав микробных клеток, различаются по их способности к молекулярному узнаванию рецепторов, содержащих D-маннозу. Показано, что адгезионные свойства *E. coli* существенно зависят от состава адгезионных пилей на их поверхности [1]. Интересно, что адгезионные пили являются структурами бактериальных клеток, весьма чувствительных к действию факторов внешней среды. Например, показано, что пили *E. coli* относительно легко деполимеризуются и смыываются с поверхности при нагревании клеток [1] и отсутствуют у клеток, выращенных при 20 °С [8]. Можно предположить, что микробные клетки могут быть использованы в качестве тест-системы, обеспечивающей контроль за состоянием окружающей среды. В этой связи было изучено влияние температуры и УФ-излучения на агрегационную активность *E. coli*.

При проведении этой серии опытов суспензию микробных клеток инактивировали либо нагреванием при 80 °С, либо УФ-облучением с

помощью облучателя ОКУФ-5М. Используемая интенсивность внешних воздействий обеспечивала полную инактивацию микробных клеток в течение нескольких минут (рис. 3).

Оказалось, что УФ-облучение суспензии *E. coli* и температурная инактивация бактериальных клеток приводят к снижению скорости межклеточной агрегации по экспоненциальному закону (рис. 4). За-

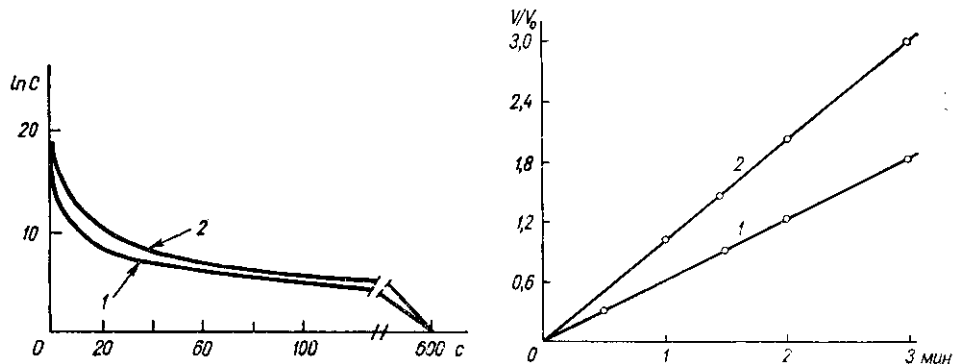


Рис. 3. Зависимость жизнеспособности клеток *E. coli* от времени УФ-облучения (1) и температурной обработки при 80 °С (2)

Рис. 4. Зависимости величины логарифма скорости межклеточной агрегации тимоцитов крыс и бактериальных клеток *E. coli* от времени УФ-облучения (1) и температурной обработки при 80 °С (2) бактериальных клеток

висимость скорости агрегации клеток от времени облучения при температурном воздействии описывается формулой

$$V = V_0 e^{-kt},$$

где V — скорость агрегации клеток; V_0 — скорость агрегации интактных клеток; t — время; k — константа реакции, характерная для данного типа воздействия. Рассчитанные значения k составляют 1,07 мин⁻¹ для УФ-облучения и 0,61 мин⁻¹ для температурного воздействия (80 °С). Очевидно, что установленная закономерность может быть использована для оценки длительности воздействия неблагоприятных факторов внешней среды на клетки, а также, по-видимому, величины экспозиционной дозы.

Существенным с точки зрения проблемы молекулярного узнавания является то обстоятельство, что наблюдаемые изменения агрегационной активности бактериальных клеток *E. coli* являются следствием изменения их поверхностных свойств в процессе инактивации. Повышенная температура и УФ-излучение вызывают шеддинг (сбрасывание) мембранных компонентов клеток во внешнюю среду [9]. Видимо, при этом бактериальные клетки теряют свои адгезионные белки, взаимодействующие с остатками маннозы на поверхности тимоцитов. Отметим, что изменение состава рецепторных структур поверхности клеток происходит под действием ряда других факторов, инициирующих процессы шеддинга [9]. На этом основании можно полагать, что любые воздействия, приводящие к десорбции мембранных белков, будут проявляться в изменении скорости межклеточной агрегации.

Таким образом, межклеточная агрегация тимоцитов крыс и бактериальных клеток *E. coli* является маннозоспецифичным процессом и может быть использована для изучения изменений свойств поверхности микробных клеток при воздействии факторов внешней среды.

Резюме

З використанням спектрофотометричного методу встановлено, що бактеріальні клітини *E. coli* викликають агрегацію тимоцитів крыс. Процес міжклітинної агрегації блокується

ся D-маннозою. Показано, що агрегаційна активність бактеріальних клітин знижується при їх інактивації ультрафіолетовим (УФ) випромінюванням і під дією високої температури (80 °С). Обговорюються механізм і можливості використання реакції міжклітинної агрегації.

Summary

It has been determined by means the light transmission technique that bacterial cells *E. coli* induce the aggregation of rat thymocytes. The process of intercellular aggregation is blocked by D-mannose. The aggregation activity of bacterial cells is decreased after their inactivation by UV-irradiation or high temperature (80 °C). The mechanisms and the application possibilities of the intercellular aggregation are discussed.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Овод В. В., Вершигора А. Е. Адгезивность бактерий // Успехи соврем. биологии.— 1982.— 94, № 2(5).— С. 213—224.
2. Езелчук Ю. В. Патогенность как функция биомолекул.— М.: Медицина, 1985.— 240 с.
3. Адамс Р. Методы культуры клеток для биохимиков.— М.: Мир, 1963.— 263 с.
4. Тимошенко А. В., Черенкевич С. Н. Агглютинация тимоцитов крыс, вызванная агрегированным конканавалином А // Биополимеры и клетка.— 1989.— 5, № 6.— С. 78—82.
5. Сунгуров А. Ю. Разделение и анализ клеток физическими методами // Итоги науки и техники.— М.: ВИНТИ, 1985.— 120 с. (Сер. Цитология; Т. 4).
6. Методы общей бактериологии / Под ред. Ф. Герхарда и др.— М.: Мир, 1984.— Т. 1.— 267 с.
7. Тимошенко А. В., Черенкевич С. Н. Влияние гипертермии на некоторые свойства мембран клеток *HeLa* // Эксперим. онкология.— 1990.— 12, № 3.— С. 63—65.
8. Blumensiek E., Jann K. Adhesion of pilated *Escherichia coli* strains to phagocytes: differences between bacteria with mannose-sensitive pili and those with mannose-resistant pili // Infect. Immunol.— 1982.— 32, N 1.— P. 264—269.
9. Тимошенко А. В., Черенкевич С. Н. Кластеры мембранных рецепторов и их движение в клетках // Успехи соврем. биологии.— 1990.— 109, № 2.— С. 206—218.

Белорус. гос. ун-т им. В. И. Ленина, Минск

Получено 24.12.90