

Проверка гипотезы “естественной виремии” на лошадях

Зелёная химия, экология и медицина

3.5 Использование наноматериалов для борьбы
с болезнетворными (вредными) грибками, бактериями,
вирусами, и т.д.

11 класс школы-интерната “Интеллектуал”, г. Москва

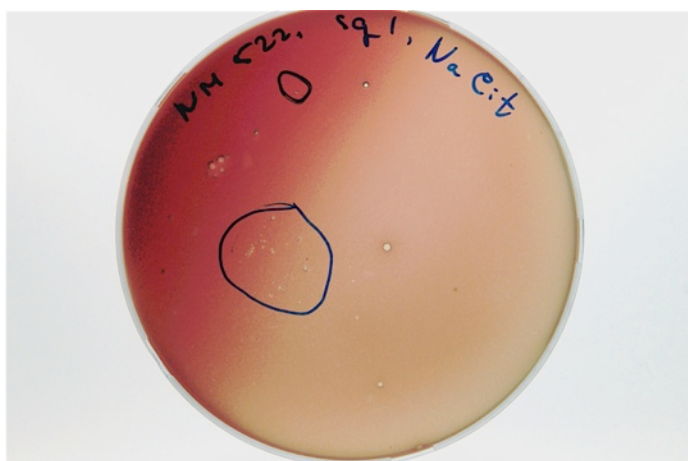
Научные руководители:

Летарова Мария Анатольевна, Летаров Андрей Викторович

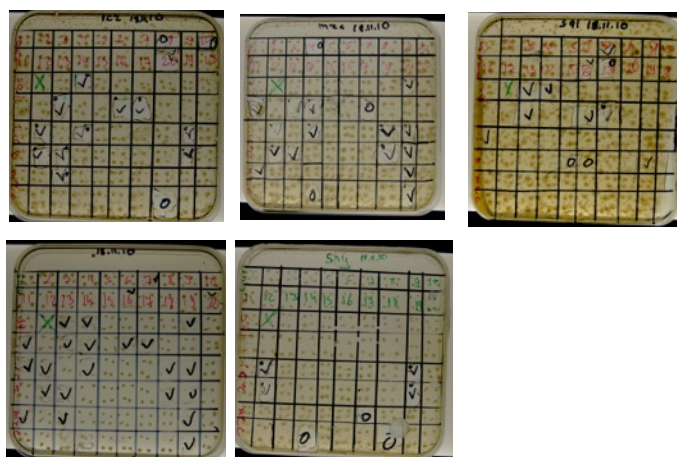
Проверка гипотезы “естественной виремии” на лошадях.

Последнее время всё более актуальной становится проблема поиска замены уже существующим антибиотикам. Так как бактерии подвержены наследственным изменениям также как и любые другие живые существа, за всё время применения антибиотиков они уже почти выработали устойчивость к большинству, если не всем известным антибиотикам. В тоже время среди нанообъектов, есть часть тех, которые могут меняться вместе с бактериями, так как уже много тысячелетий эволюционируют вместе с бактериями по принципу “ключ-замок”. Кроме того эти объекты (бактериофаги) очень специфичны, следовательно они могли бы быть замечательной альтернативой антибиотикам. Ещё в 1921 Феликс Д’Эррель предположил, что они играют существенную роль в антибактериальной защите организма (d’Herelle, 1921). Сейчас фаговая терапия достигла значительных успехов в лечении инфекций, локализованных в лёгкодоступных местах, но о системном применении можно говорить только как о внутривенном введении бактериофагов. Также не существует стопого доказательства влияния естественных бактериофагов на антибактериальную защиту организма (см. обзор Gorski and Weber-Dabrowska 2005). В тоже время предполагается, что бактериофаги могут непосредственно проникать в кровоток через слизистые оболочки желудочно-кишечного тракта (ЖКТ). А. Горским было высказано предположение, что и естественные бактериофаги тоже могут проникать в кровь здоровых людей и животных и транспортироваться в ткани и органы организма. Такое гипотетическое состояние было названо “физиологическая виремия” (Gorski et al. 2006).

В данной работе была проверена гипотеза “естественной виремии”. Для проверки были выбраны лошади с высокими титрами естественных колифагов в фекалиях, деагностированных на лабораторном и аутоштаммах. После чего лабораторные и аутоштаммы были использованы как тест-штаммы на присутствие бактериофагов в крови. Однако, несмотря на высокие титры бактериофагов в фекалиях, в крови этих лошадей не было обнаружено жизнеспособных фаговых частиц, также не было обнаружено фаг-



Посев крови двойным слоем: первый слой - LB твёрдый; второй слой - LB мягкий + кровь одной из лошадей + реагент против свёртывания крови + один из тест-штаммов



Поиск аутоштаммов: на “фаговый агар” и чашку с обычным, “чистым” агаром было перенесено примерно 30 колоний изолятов *E. coli* выделенных ранне на агаре Эндо из фекальных экстрактов четырёх разных лошадей, после чего я сравнила качество роста штаммов с контрольной чашкой.

нейтрализующей активности крови. Из чего был сделан вывод, что состояние “физиологической виремии” для здоровой лошади не характерно.

Последнее время всё более актуальной становится проблема поиска замены уже существующим антибиотикам. Так как бактерии подвержены наследственным изменениям также как и любые другие живые существа, за всё время применения антибиотиков они уже почти выработали устойчивость к большинству, если не всем известным антибиотикам. В тоже время среди нанообъектов, есть часть тех, которые могут меняться вместе с бактериями, так как уже много тысячелетий эволюционируют вместе с бактериями по принципу “ключ-замок”. Кроме того эти объекты (бактериофаги) очень специфичны, следовательно они могли бы быть замечательной альтернативой антибиотикам. Ещё в 1921 Феликс Д’Эррель предположил, что они играют существенную роль в антибактериальной защите организма (d’Herelle, 1921). Сейчас фаговая терапия достигла значительных успехов в лечении инфекций, локализованных в лёгкодоступных местах, но о системном применении можно говорить только как о внутривенном введении бактериофагов. Также не существует стогого докозательства влияния естественных бактериофагов на антибактериальную защиту организма (см. обзор Gorski and Weber-Dabrowska 2005). В тоже время предполагается, что бактериофаги могут непосредственно проникать в кровоток через слизистые оболочки желудочно-кишечного тракта (ЖКТ). А. Горским было высказано предположение, что и естественные бактериофаги тоже могут проникать в кровь здоровых людей и животных и транспортироваться в ткани и органы организма. Такое гипотетическое состояние было названо “физиологической виремией” (Gorski et al. 2006).

Я решила проверить гипотезу на лошадях, так как целлюлолитическое сообщество у лошадей очень стабильно и, в то же время, очень разнообразно (Куликов с соавт. 2007). Кроме этого у здоровых лошадей преобладают вирулентные фаги, а не умеренные, как у некоторых млекопитающих, включая человека (Reyes et al. 2010).

Для исследования мы (я и мои научные руководители) отобрали трех особей, которые обладали высоким ($>10^3$ БОЕ \cdot г $^{-1}$) титром колифагов, определяемых на лабораторном штамме *NM522* в фекалиях, и проверили, чтобы высокий титр сохранился и в день исследования (Табл 1.) . От выбранных животных были также получены изоляты индигенных *E. coli*. Типирование выборок этих изолятов с помощью IS1 ПЦР фингрепринтинга (рис 1, 2) подтвердило высокий уровень внутривидовой гетерогенности индивидуальных популяций *E. coli*. Мы включили в набор тест-культур несколько изолятов, полученных от этих же животных. Для отбора индигенных штаммов, чувствительных к доминирующим у данных животных естественным бактериофагам, были приготовлены накопительные культуры фекалий: 2г фекалий суспензировали в 8 мл жидкой среды LB инкубировали в течении 18 часов при 37⁰ С на качалке. При этом происходило накопление индигенных бактериофагов за счёт присутствующих в материале хозяев. Супернатанты полученных накопительных культур, обработанных хлороформом, были использованы для приготовления «фагового агара». На получившиеся четыре чашки Петри с фаговым агаром стерильными зубочистками были переколоты 30 случайно выбранных клонов эндогенных штаммов, каждый клон был переколот на все пять чашек (рис 3). Те клоны, которые не выросли или выросли плохо (по сравнению с контрольной чашкой с твердой средой LB, без фага), были отобраны для определения титра фагов непосредственно в фекалиях. Те штаммы, на которых титр фага оказался максимальным, были дополнительно расчищены путем посева отдельных колоний, уникальность штаммов была определена с помощью ПЦР-фингерпринта и в результате были отобраны 6 эндогенных штаммов, включённых в набор тест-культур наряду со штаммом *NM522*. Видовая принадлежность этих культур (*E. coli*) была подтверждена с

помощью анализа профиля белков методом масспектрометрии MALDI-TOF на приборе Biotyper (Bruker-Daltonics), в соответствии с рекомендациями производителя.

У выбранных животных одновременно были взяты образцы крови и образцы фекалий, на отобранных штаммах кишечной палочки был определен титр колифагов (см. Табл. 1).

Для определения колифагов в крови 1 мл крови смешивали с 50 мкл свежей культуры ($A_{600} = 0,6$) одного из выбранных штаммов, добавили в 2 мл среды LB (0,6% агар-агара) и выливали на чашку с твердой средой. Каждый образец крови был посеян на каждый аутоштамм и на лабораторный штамм *NM 522*. Контроль осуществлялся путем такого же посева вместе с образцом крови известного количества бактериофага из коллекции лаборатории и сравнение его титра на чашках с кровью и культурой и просто с культурой. Эти титры не различались, что свидетельствует о том, что если фаг присутствует в крови, то на чашках он, скорее всего, вырастет в том же титре.

После культивирования при 37⁰ C на чашках признаков роста фагов обнаружено не было. Тем не менее, все аномалии газона, которые могли быть мелкими или мутными фаговыми бляшками, были протестированы переносом на свежий газон соответствующего штамма. Роста бактериофагов обнаружено не было (рис 4).

Параллельно с посевом на чашки в жидкой среде LB были поставлены накопительные культуры, содержащие по 2 мл крови и инокулят одного из штаммов (протестированы все комбинации). Посев супернатантов этих культур на газоны соответствующих штаммов также дал отрицательный результат.

Чтобы исключить предположение о фаг-нейтрализующей активности сыворотки крови, аликвоты сыворотки были смешаны с фаг-содержащим экстрактом фекалий тех же животных. После инкубации титр фага по сравнению с контролем (без сыворотки) не изменился.

Таким образом, массовое проникновение бактериофагов из ЖКТ в кровь, по-видимому, не характерно для здоровых лошадей. Использование аутоштаммов в качестве тест-культур позволяет предположить, что данный вывод верен для многих различных (если не всех) бактериофагов, присутствовавших в индивидуальных вириомах животных в момент эксперимента. Следует отметить, что в эксперимент были взяты животные обладающие подтвержденным высоким титром колифагов в фекалиях непосредственно в день эксперимента, а значит, фаг в высоких титрах находился в прямой кишке по крайней мере, за 8 часов до начала эксперимента (Milinovich et al. 2006). С учётом объема толстого кишечника, включая слепую кишку и объема циркулирующей крови у лошади, то, при условии, что равновесная концентрация бактериофагов в крови как минимум на четыре-шесть порядков меньше, чем в гастроинтестинальной системе (Gorski et al. 2006), и поэтому видится маловероятным, чтобы явление «физиологической фагемии», в том числе и перенос фагов по кровяному руслу, играло существенную роль в формировании антибактериальной защиты организма лошади. Следовательно, нужно искать другие способы системного применения бактериофагов и пытаться предположить другие пути проникновения бактериофагов и других вирусов в кровотоки (например, через оболочки лёгких при газообмене).

Список литературы

Gorski, A. and Weber-Dabrowska, B. 2005. The potential role of endogenous bacteriophages in controlling invading pathogens. *Cell Mol. Life Sci.*, **62**: 511–519.

Gorski, A., Wazna, E., Weber-Dabrowska, B., Dabrowska, K., Switala-Jelen, K. and Miedzybrodzki R. 2006. Bacteriophage translocation. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **46**: 313-319

d'Herelle F. 1921. La bactériophage. Son rôle dans l'immunité. Paris. Cited after Russian edition (1926), Moscow – Leningrad : State Editor

Куликов Е.Е., Исаева А.С., Роткина А.С., Манькин А.А. и Летаров А.В. 2007. Биоразнообразие и динамика бактериофагов в фекалиях лошадей. *Микробиология.* **76**, 271-278

Reyes, A., Haynes, M., Hanson, N., Angly, F.E., Heath, A.C., Rohwer, F. and Gordon, J.I. 2010. Viruses in the faecal microbiota of monozygotic twins and their mothers. *Nature*, **466**: 334-U81

Milnovich, G.J., Trott, D.J., Burrell, P.C., van Eps, A.W., Thoenner, M.B., Blackall, L.L., Al Jassim, R.A., Morton and J.M., Pollitt, C.C. 2006. Changes in equine hindgut bacterial populations during oligofructose-induced laminitis. *Environ. Microbiol.* **8**: 885-898

Приложения

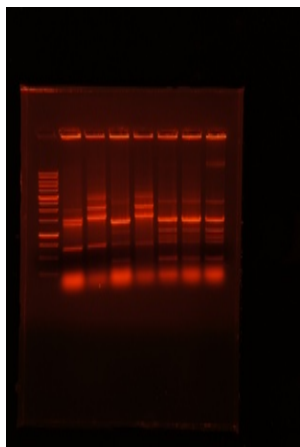
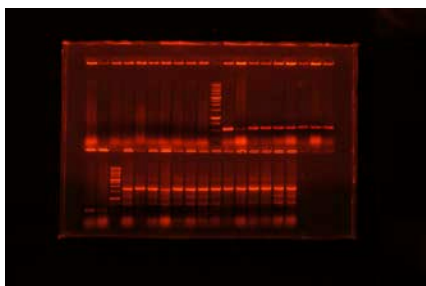


Рис. 1, 2 IS1 ПЦР профилинг аутоштаммов

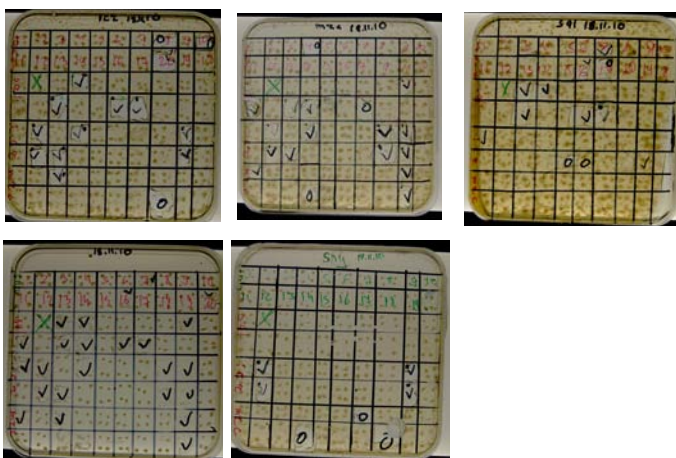


Рис. 3 Поиск аутоштаммов: на “фаговый агар” и чашку с обычным, “чистым” агаром было перенесено примерно 30 колоний изолятов *E. coli* выделенных ранне на агаре Эндо из фекальных экстрактов четырёх разных лошадей, после чего я сравнила качество роста штаммов с контрольной чашкой.



Рис. 4 Аномалии газона переколотые на бактериальный агар

штаммы <i>E.coli</i>	Титр колифагов в фекалиях лошадей		
	БОЕ/г		
	М	S	В
NM522	$2 \cdot 10^6$	$3 \cdot 10^3$	$2 \cdot 10^7$
Ic19/5	$7 \cdot 10^3$	$4 \cdot 10^3$	$6 \cdot 10^3$
mr14/1	$6 \cdot 10^3$	0	$8 \cdot 10^3$
mr14/7	0	$1 \cdot 10^3$	0
sq13/4	$1 \cdot 10^3$	$2 \cdot 10^3$	$2 \cdot 10^3$
mr19/6	$2 \cdot 10^4$	0	0
mr19/10	$2 \cdot 10^3$	$4 \cdot 10^3$	$3 \cdot 10^3$

Табл. 1. Титры колифагов в фекалиях трех лошадей, полученные в день забора крови (обозначенных как М, S и В).

Сведения об авторе

Работа выполнялась мной в Институте Микробиологии им. С. Н. Виноградского РАН в лаборатории Вирусологии под руководством Летаровой М. А. и Летарова А. В. По времени работа заняла где-то полтора года (посещала институт один-два раза в неделю и почти каждый день во время школьных каникул). Сейчас учусь в 11 классе школы-интерната “Интеллектуал”. Микробиологией начала интересоваться с 7ого класса. В 8ом классе сделала работу вместе со своим школьным учителем по биологии Ельцовой Мариной Анатольевной - “Исследование состава воздуха в школьных помещениях”. После чего получила возможность выполнять дальнейшую работу на более интересные темы в научном институте.