



УДК: 579.61:616–094

БИОПЛЕНКА *HELICOBACTER PYLORI* IN VITRO И IN VIVO

Жуховицкий В. Г.^{1,2,3}, Смирнова Т. А.¹, Шевлягина Н. В.¹, Коржева И. Ю.², Диденко Л. В.¹, Гинцбург А. Л.^{1,3}

¹ ФГБУ «ФНИЦ эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России

² ГБУЗ ГКБ им. С.П. Боткина Департамента здравоохранения г. Москвы

³ ФGAOУ ВО «Первый МГМУ им. И.М. Сеченова» Минздрава России

HELICOBACTER PYLORI BIOFILM IN VITRO AND IN VIVO

Zhukhovitsky V. G.^{1,2,3}, Smirnova T. A.¹, Shevlyagina N. V.¹, Korzheva I. Yu.², Didenko L. V.¹, Gintsburg A. L.^{1,3}

¹ Gamaleya Federal Research Centre for Microbiology and Immunology of the Ministry of Public Health

² Botkin Hospital of Moscow Department of Public Health

³ Sechenov the First Moscow Medical University of the Ministry of Public Health

**Жуховицкий
Владимир Григорьевич**
Zhukhovitsky Vladimir G.
zhukhovitsky@rambler.ru

Жуховицкий В. Г. — к.м.н., с.н.с., заведующий лабораторией индикации и ультраструктурного анализа микроорганизмов, доцент кафедры инфектологии и вирусологии

Смирнова Т. А. — д.м.н., ведущий научный сотрудник лаборатории индикации и ультраструктурного анализа микроорганизмов

Шевлягина Н. В. — к.м.н., старший научный сотрудник лаборатории индикации и ультраструктурного анализа микроорганизмов

Коржева И. Ю. — д.м.н., заведующая отделением эндоскопии

Диденко Л. В. — д.м.н., заведующая лабораторией анатомии микроорганизмов

Гинцбург А. Л. — д.б.н., профессор, академик РАН, директор, заведующий кафедрой инфектологии и вирусологии

Резюме

С помощью сканирующей электронной микроскопии изучена способность эталонных и свежеевыделенных штаммов *Helicobacter pylori* к образованию биоплёнки при культивировании на абиогенных носителях и в естественных условиях существования. Показано, что штаммы обоих типов способны к образованию биоплёнки in vitro, причём по сравнению со свежеевыделенными штаммами, эталонные штаммы *Helicobacter pylori* синтезируют менее выраженный экзоточный матрикс и манифестируют менее выраженный жгутиковый аппарат. Биоплёнка была обнаружена и в образцах слизистой оболочки антрального отдела желудка при язвенной болезни двенадцатиперстной кишки, причём структура матрикса такой биоплёнки выглядела неоднородной на различных участках эпителиального пласта.

Ключевые слова: *Helicobacter pylori*, биоплёнка, сканирующая электронная микроскопия.

Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология 2017; 141 (5): 14–19

Summary

Using scanning electron microscopy, the ability of reference and freshly isolated *Helicobacter pylori* strains to form biofilm under cultivation on abiotic surfaces and in natural conditions was studied. It was shown that both types of strains were capable of biofilm formation in vitro, although reference strains synthesized less pronounced exocellular matrix and flagella than freshly isolated strains. Bio-film also was detected in specimens of antral mucosa under duodenal ulcer. Most often *Helicobacter pylori* biofilms were detected near the mouths of the gastric glands. The structure of matrix surface of such biofilms looked inhomogeneous in different parts of the epithelial layer.

Keywords: *Helicobacter pylori*, biofilm, scanning electron microscopy.

Experimental'naya i Klinicheskaya Gastroenterologiya 2017; 141 (5): 14–19

Введение

Helicobacter pylori (пилорический хеликобактер — ПХ), инфицирующий не менее половины человеческой популяции [1], является этиопатогенетическим фактором гастрита, язвенной болезни желудка и двенадцатиперстной кишки [2], а также расценивается как фактор риска в возникновении некоторых форм рака желудка [3].)

Несмотря на то, что отдельные факторы патогенности ПХ — адгезины, вакуолизирующий токсин, ассоциированный с цитотоксичностью протеин, разнообразные белки наружной мембраны и др. — охарактеризованы достаточно подробно [4], описание патогенеза хеликобактериоза носит фрагментарный характер [5]. Последнее обстоятельство в значительной степени обусловлено отсутствием методологических подходов к комплексному изучению механизмов колонизации, персистенции, реализации патогенного потенциала [6, 7, 8]. Согласно современным представлениям, колонизация того или иного биотопа, персистенция в нём и патогенное воздействие на соответствующую систему отклика обеспечивают способностью бактериальной популяции к образованию биоплёнки [9] — структурированного

сообщества бактериальных клеток, заключённого в продуцируемый им самим полимерный матрикс и адгезированного к инертным или живым поверхностям [10].

Способность ПХ к биофильмогенезу как *in vitro*, так и в естественных условиях существования, убедительно продемонстрирована в ряде оригинальных сообщений [11, 12]; более того, эта способность свойственна и так называемым кокковидным формам ПХ [13]. (Далеко небесспорный термин “кокковидные формы *H. pylori*” традиционно применяется вместо методологически строгого “формы *H. pylori* с дефектной клеточной стенкой” [14]). Однако особенности структурной организации биоплёнок и динамика их образования как *in vitro*, так и в естественных условиях — при ассоциированной с ПХ гастродуоденальной патологии — изучена недостаточно.

Цель настоящего исследования: описание морфологических особенностей биоплёнки ПХ в условиях культивирования *in vitro* и в биопсийных образцах слизистой оболочки антрального отдела желудка больных язвенной болезнью двенадцатиперстной кишки.

Материалы и методики исследования

В работе были использованы как эталонные штаммы *H. pylori* NCTC 11637 и NCTC 11639, так и штаммы ПХ клинического происхождения, свежeweделенные из слизистой оболочки антрального отдела

желудка пациентов, страдающих язвенной болезнью двенадцатиперстной кишки и не получавших когда-либо противохеликобактерную эрадикационную терапию.

А. Отбор исследуемых образцов

Образцы слизистой оболочки антрального отдела желудка отбирались в ходе верхней эзофагогастродуоденоскопии, выполнявшейся с помощью видеогастроскопа. Образцы, предназначенные для

бактериологического исследования, помещались в транспортную среду «Cary-Blair Medium», для электронномикроскопического — в 10 %-ный нейтральный формалин.

Б. Выделение и культивирование культур ПХ

Бактериологическое исследование выполнялось согласно [15]: образцы высевались на среду “Columbia Agar Base” с дефибрированной лизированной лошадиной кровью 7 % [об/об]; и ванкомицином (1,5 мкг/мл), налидиксовой кислотой (5 мкг/мл), амфотерицином В (1 мкг/мл) и хлоридом трифенилтетразолиума — ТТХ — 10 мкг/мл. Посевы инкубировались при 37 °С в микроаэробной

атмосфере (5 % O₂, 10 % CO₂, 85 % N₂) в течение 72, 96, 120 час. Идентификация выделенных культур производилась посредством оксидазного, каталазного и быстрого уреазного тестов.

Культивирование эталонных и свежeweделенных культур ПХ осуществлялось аналогичным выделению образом на кровяном агаре на основе “Columbia Agar Base” без антибиотиков.

В. Индукция биоплёнокообразования ПХ *in vitro*

Способность эталонных и свежeweделенных штаммов ПХ к образованию биоплёнки на абиогенном носителе изучалась следующим образом: взвесью в фосфатном буфере (рН 7,0) материала 48-часовой агаровой культуры испытуемого штамма оптической плотностью 1McF инокулировались поверхности нескольких стерильных дисков диаметром 6 мм и толщиной 4 мм, изготовленных

из нержавеющей стали; спустя 24, 48, 72, 96, 120 час инкубации при комнатной температуре диски трижды отмывались фосфатным буфером, фиксировались 10 % нейтральным формалином, высушивались под восходящим ламинарным потоком стерильного воздуха и микроскопировались, как то описано ниже.

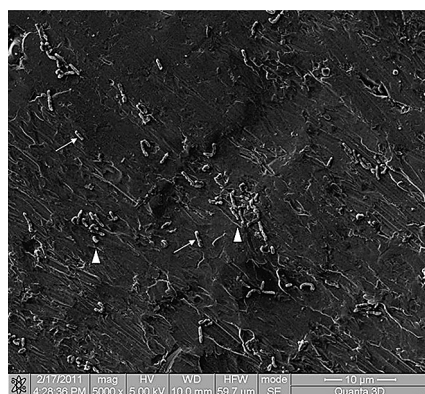
Г. Электронномикроскопическое исследование

Ультрaструктурные особенности биофильмогенеза ПХ *in vitro* и в естественных условиях существования

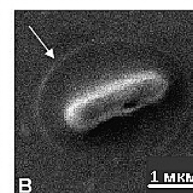
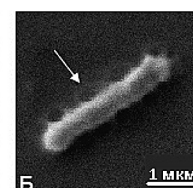
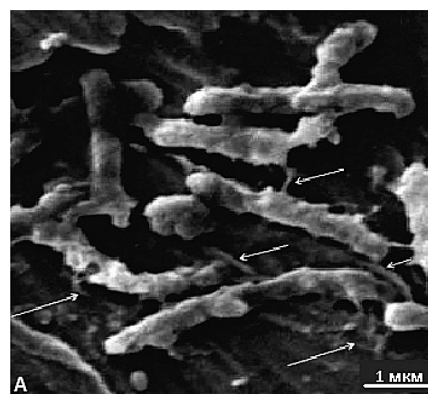
были изучены с помощью сканирующего двухлучевого ионно-электронного микроскопа.

Рисунок 1.

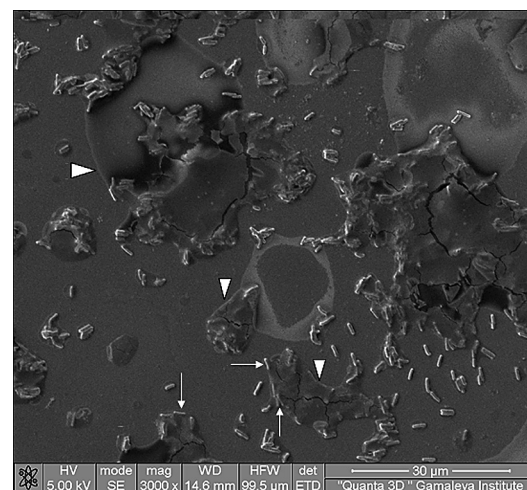
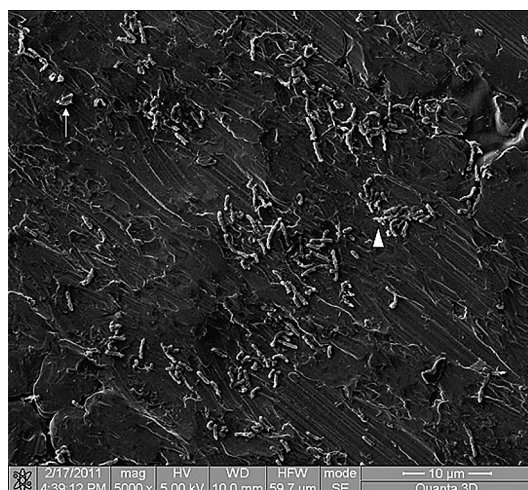
Культивирование *H. pylori* на поверхности абиогенного носителя; 24 часа. Сканирующая электронная микроскопия. (А) Одиночные бактериальные клетки (↑) и микроколонии (Δ) свежевыделенного штамма *H. pylori*.

**Рисунок 2.**

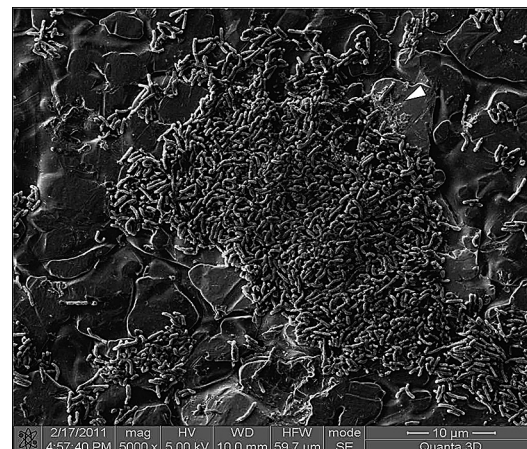
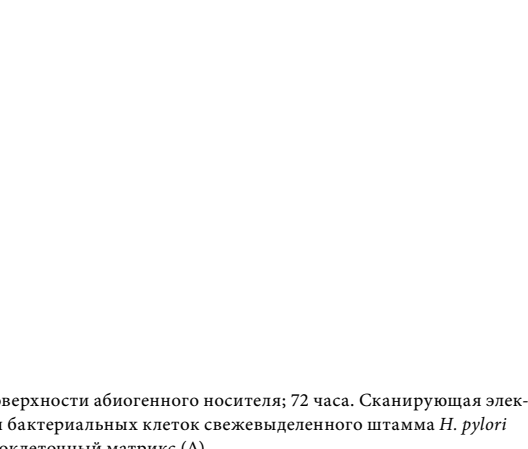
Культивирование *H. pylori* на поверхности абиогенного носителя; 24 часа. Сканирующая электронная микроскопия. Жгуты (↑) бактериальных клеток свежевыделенного штамма (А). Ореол электронопрозрачного вещества (↑), окружающий бактериальные клетки эталонных штаммов *H. pylori* NCTC11637 (Б) и *H. pylori* NCTC11639 (В).

**Рисунок 3.**

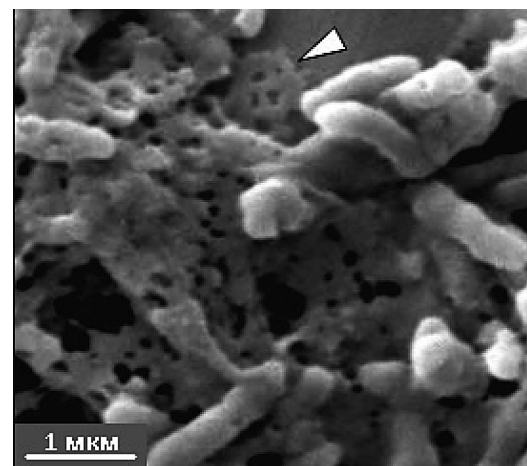
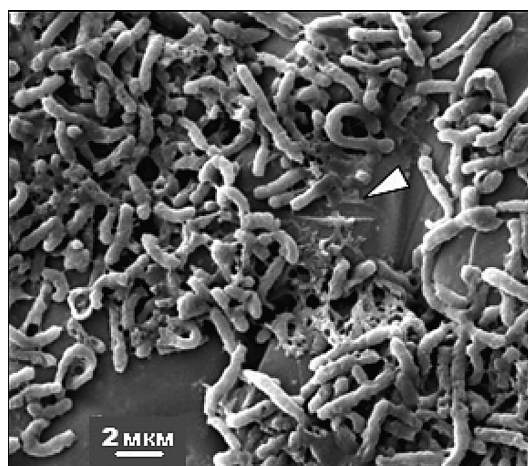
Культивирование *H. pylori* на поверхности абиогенного носителя; 48 часов. Сканирующая электронная микроскопия. Рыхлый экзоклеточный матрикс свободно расположенных (↑) и входящих в состав микроколонии (Δ) бактериальных клеток свежевыделенного штамма *H. pylori*.

**Рисунок 4.**

Культивирование *H. pylori* на поверхности абиогенного носителя; 48 часов. Сканирующая электронная микроскопия. Бактериальные клетки (↑) микроколоний эталонного штамма *H. pylori* NCTC11639, погруженные в электронопрозрачный экзоклеточный матрикс (Δ).

**Рисунок 5.**

Культивирование *H. pylori* на поверхности абиогенного носителя; 72 часа. Сканирующая электронная микроскопия. Колония бактериальных клеток свежевыделенного штамма *H. pylori* высокой множественности. Экзоклеточный матрикс (Δ).

**Рисунок 6.**

Культивирование *H. pylori* на поверхности абиогенного носителя; 72 часа. Сканирующая электронная микроскопия. Колония бактериальных клеток свежевыделенного штамма *H. pylori* высокой множественности. Экзоклеточный матрикс (Δ).

Фиксированные формалином образцы слизи-стой оболочки желудка помещались на кремниевые подложки и, как и диски, инокулированные культурами ПХ и подготовленные вышеописанным способом, высушивались под восходящим ламинарным потоком стерильного воздуха.

Исследуемые образцы обоих типов, не подвергались дегидратации и напылялись электронопроводящим слоем золота (проба Au₉₉₉) толщиной 5 нм в напылительной установке.

Результаты и обсуждение

А. Изучение способности ПХ к образованию биоплёнки in vitro

К 24 часам инкубации in vitro как эталонные, так и свежесекретированные штаммы ПХ демонстрировали адгезию к поверхности абиогенного носителя (рис. 1); при этом, здесь обнаруживались как одиночные бактериальные клетки, так и микроколонию в начальной фазе своего формирования. Бактериальные клетки микроколонию свежесекретированного, но не эталонного штамма ПХ обладали жгутиками (рис. 2а); вокруг одиночно располагающихся бактериальных клеток эталонных штаммов ПХ обнаруживался более или менее отчетливо контурированный ореол электронопрозрачного вещества (рис. 2б, 2в).

К 48 часам инкубации отмечалось некоторое возрастание множественности микроколонию свежесекретированного штамма и частичное слияние их друг с другом (не иллюстрируется); часть как свободно расположенных, так и входящих в состав микроколонию бактериальных клеток была покрыта “ключьями” рыхлого экзоскелетного матрикса (рис. 3). Бактериальные клетки микроколонию

эталонного штамма ПХ выглядели погружёнными в электронопрозрачное вещество экзоскелетного матрикса, охватывающего микроколонию сплошным, однородным, резко очерченным массивом (рис. 4).

К 72 часам инкубации отмечалось значительное возрастание множественности микроколонию обоих штаммов, бактериальные клетки которых были покрыты выраженным слоем рыхлого экзоскелетного матрикса (рис. 5, 6, 7).

С увеличением сроков инкубации до 96-ти часов крупные колонии как эталонного, так и свежесекретированного штамма ПХ были полностью покрыты выраженным слоем плотного экзоскелетного матрикса, на поверхности и по периферии которого выявлялись отдельные бактериальные клетки (рис. 8).

К 120-ти часам инкубации по периферии слоя массивного экзоскелетного матрикса эталонного штамма ПХ встречались крупные и мелкие, не сливающиеся между собой, вздутия (рис. 9).

Б. Изучение биоплёнки ПХ в естественных условиях существования

При исследовании биоптатов слизистой оболочки антрального отдела желудка бактериальные биоплёнки ПХ были обнаружены на поверхности эпителиального пласта, преимущественно в устьях желез (рис. 10); бактериальные клетки, входящие в состав биоплёнки, демонстрировали различную степень погружённости в её матрикс и сохраняли типичную для ПХ размеры и форму (рис. 11). При этом, морфологическая картина поверхности матрикса биоплёнки выглядела неоднородной на различных участках эпителиального пласта: участки, содержащие выступающие на

поверхность матрикса микроколонию бактериальных клеток, соседствовали с участками, отличающимися сглаженной поверхностью, лишённой каких-либо морфологических признаков присутствия бактериальных клеток в подлежащих слоях (рис. 11).

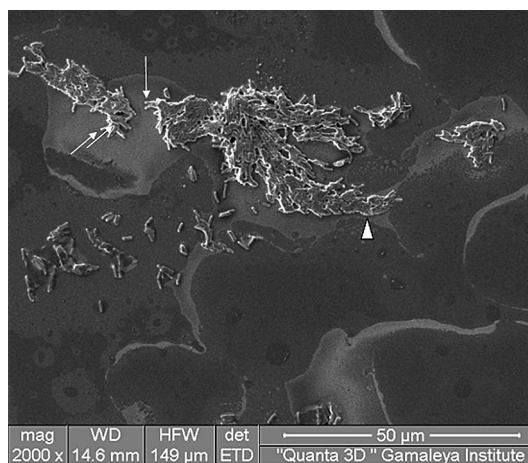
Полученные результаты, представляющие несомненный интерес для изучения биофильмогенеза ПХ в различных условиях существования, указывают на необходимость дальнейшего изучения ультраструктуры биоплёнки ПХ с помощью трансмиссионной электронной микроскопии.

Заключение

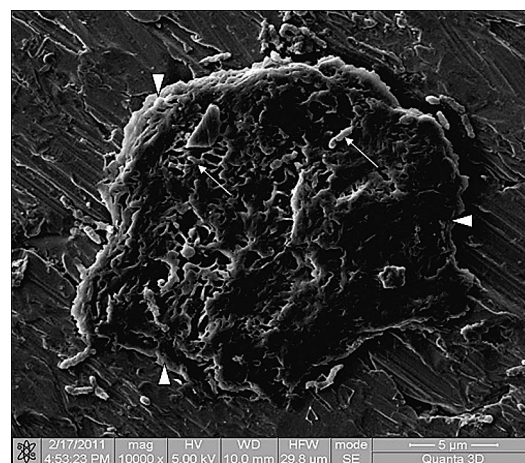
1. Как эталонные, так и свежесекретированные штаммы ПХ способны к образованию биоплёнки при культивировании in vitro.
2. По сравнению со свежесекретированными штаммами, эталонные штаммы ПХ при культивировании in vitro синтезируют менее выраженный экзоскелетный матрикс и манифестируют менее выраженный жгутиковый аппарат.
3. В биопсийных образцах слизистой оболочки антрального отдела желудка, отобранных при язвенной болезни двенадцатиперстной кишки, биоплёнка ПХ обнаруживается, как правило, вблизи устьев желудочных желез.
4. Формирование биоплёнки на поверхности слизистой оболочки желудка является одним из механизмов персистенции ПХ и одной из наиболее вероятных причин низкой эффективности эрадикационной терапии.

Рисунок 7.

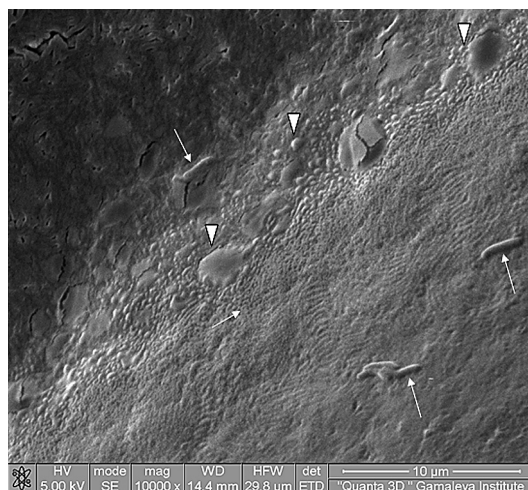
Культивирование *H. pylori* на поверхности абиогенного носителя; 72 часа. Сканирующая электронная микроскопия. Бактериальные клетки (↑) микроколоний эталонного штамма *H. pylori* NCTC 11639, заключённые в экзоклеточный матрикс (Δ).

**Рисунок 8.**

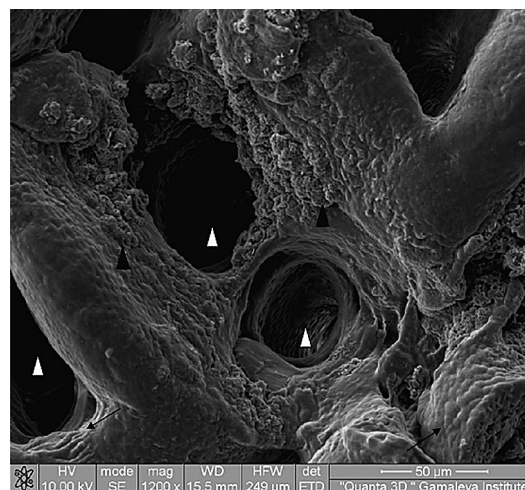
Культивирование *H. pylori* на поверхности абиогенного носителя; 120 часов. Сканирующая электронная микроскопия. Бактериальные клетки (↑) свежeweделенного штамма *H. pylori*, заключённые в экзоклеточный матрикс (Δ).

**Рисунок 9.**

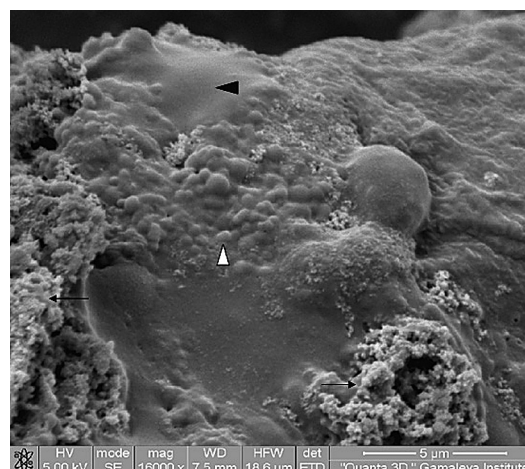
Культивирование *H. pylori* на поверхности абиогенного носителя; 120 часов. Сканирующая электронная микроскопия. Бактериальные клетки (↑) микроколоний эталонного штамма *H. pylori* NCTC 11637 на поверхности экзоклеточного матрикса и вздутия по его периферии (Δ).

**Рисунок 10.**

Биоплёнка *H. pylori* при язвенной болезни 12-типерстной кишки. Слизистая оболочка антрального отдела желудка. Сканирующая электронная микроскопия. Биоплёнка (↑), скопления фибрина (▲), устье железы желудка (Δ).

**Рисунок 11.**

Биоплёнка *H. pylori* при язвенной болезни двенадцатиперстной кишки. Слизистая оболочка антрального отдела желудка. Сканирующая электронная микроскопия. Скопления фибрина (↑), контуры микроколоний *H. pylori* в толще биоплёнки (Δ), сглаженная поверхность биоплёнки (▲).



Литература

1. Eusebi L.H., Zagari R. M., Bazzoli F. Epidemiology of *Helicobacter pylori* infection // *Helicobacter*. — 2014. — v. 19 (Suppl. 1). — P. 1–5.
2. Amieva M. R., El-Omar E.M. Host-bacterial interactions in *Helicobacter pylori* infection // *Gastroenterology*. — 2008. — v. 134. — P. 306–323.
3. Wroblewski L.E., Peek R. M., Wilson K. T. *Helicobacter pylori* and gastric cancer: factors that modulate disease risk // *Clin. Microbiol. Rev.* — 2010. — v. 23. — P. 713–739.
4. Shiota S., Suzuki R., Yamaoka Y. The significance of virulence factors in *Helicobacter pylori* // *J. Dig. Dis.* — 2013. — v. 14. — No. 7. — P. 341–349.
5. Sgouras D.N., Trang T. T.H., Yamaoka Y. Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection // *Helicobacter*. — 2015. — v. 20. No. 1. — P. 8–16.
6. Salama N.R., Hartung M. L., Müller A. Life in the human stomach: persistence strategies of the bacterial pathogen *Helicobacter pylori* // *Nat. Rev. Microbiol.* — 2013. — v. 11. — No 6. — P. 385–399.
7. Rhee K.H., Park J. S., Cho M. J. *Helicobacter pylori*: bacterial strategy for incipient stage and persistent colonization in human gastric niches // *Yonsei Med. J.* — 2014. — v. 55. — No. 6. — P. 1453–1466.
8. Cellini L. A chameleon-like approach to life // *World J. Gastroenterol.* — 2014. — 20 (19). — P. 5575–5582.
9. Costerton J. W., Lewandowski Z., Caldwell D. E. et al. Microbial biofilms // *Annu. Rev. Microbiol.* — 1995. — v. 41. — P. 435–464.
10. Costerton J. W., Cheng K.-J., Geesey G. G. et al. Bacterial biofilms in nature and disease // *Annu. Rev. Microbiol.* — 1987. — v. 49. — P. 711–745.
11. Cole S., Harwood J., Lee R., She R., Guineyr D. G. Chracterization of monospecies biofilm formation by *Helicobacter pylori* // *J. Bacteriol.* — 2004. — v. 10. — P. 3124–3132.
12. Carron M. A., Tran V. R., Sugawa C., Coticchia J. M. Identification of *Helicobacter pylori* biofilms in human gastric mucosa // *J. Gastrointest. Surg.* — 2006. — v. 10. — No. 5. — P. 712–717.
13. Andersen L. P., Rasmussen L. *Helicobacter pylori*-coccoid forms and biofilm formation // *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* — 2009. — v. 56. — No. 2. — P. 112–115.
14. Zhukhovitsky V. G. Coccoid forms of *Helicobacter pylori* to be cut off with Occam's razor! // *Intern. J. Med. Microbiol.* — 2001. — v. 291 (Suppl. 31). — abst. # K/19. — P. 99.
15. Жуховицкий В. Г. Микробиологическая диагностика хеликобактериоза // *Эксперимент. клин. гастроэнтерол.* — 2008. — № 8. — С. 34–45.