

УДК 576.524:574.52:612.396.175: 616.931

©Коллектив авторов

## ИНГИБИРОВАНИЕ АДГЕЗИИ *C. DIPHTHERIAE* К БУККАЛЬНОМУ ЭПИТЕЛИЮ ЧЕЛОВЕКА ГЛИКОЗИД ГИДРОЛАЗАМИ ИЗ МОРСКИХ ГИДРОБИОНТОВ

Т.С. Запорожец<sup>1\*</sup>, И.Д. Макаренкова<sup>1</sup>, И.Ю. Бакунина<sup>2</sup>, Ю.В. Бурцева<sup>2</sup>,  
М.И. Кусайкин<sup>2</sup>, Л.А. Балабанова<sup>2</sup>, Т.Н. Звягинцева<sup>2</sup>, Н.Н. Беседнова<sup>1</sup>,  
В.А. Рассказов<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Государственное учреждение научно-исследовательский институт  
эпидемиологии и микробиологии Сибирского отделения РАМН, 690087,  
г. Владивосток, ул. Сельская, 1; тел.: (3243)44-24-46; факс: (4232)44-11-47;  
эл. почта: niiem\_vl@mail.ru

<sup>2</sup>Тихоокеанский институт биоорганической химии Дальневосточного отделения  
РАН, 690022 Владивосток, просп. 100 лет Владивостоку, 159; тел.: (4232)310305;  
эл. почта: bakun@mail.ru

Исследовали возможность ингибирования адгезии *Corynebacterium diphtheriae* к клеткам буккального эпителия  $\alpha$ -галактозидазой из морской бактерии *Pseudoalteromonas sp.* КММ 70; суммарным препаратом ферментов и  $\beta$ -1,3-глюканазой из морского гриба *Chaetomium indicum*; суммарным препаратом ферментов и  $\beta$ -1,3-глюканазой из моллюска *Littorina kurila*, а также суммарным препаратом ферментов из кристаллического стебелька двустворчатого моллюска *Spisula sachalinensis*.

Все исследуемые ферменты обнаружили способность прерывать адгезию *C. diphtheriae* на буккальном эпителии. Торможение адгезии было наиболее выраженным в случае обработки эпителиоцитов высокоочищенными ферментами морских гидробионтов по сравнению с суммарными препаратами ферментов. Максимальный эффект был получен в том случае, когда ферментами обрабатывали клетки с уже адгезированными микроорганизмами.

Полученные результаты показывают, что деградация углеводов, экспрессированных на поверхности эукариотических клеток или бактерий, гликозид-гидролазами из морских гидробионтов может изменять их структуру и, нарушая уникальность и специфичность лектин-углеводного связывания, препятствовать адгезионному контакту.

**Ключевые слова:** *C. diphtheriae*, адгезия, гликозид гидролазы, морские гидробионты.

**ВВЕДЕНИЕ.** Все микроорганизмы обладают выраженной способностью прикрепляться к органическим и неорганическим поверхностям. Естественный образ жизни большинства микроорганизмов, как патогенных, так и непатогенных, связан с их закреплением на каких-либо субстратах. Адгезия – первый шаг в колонизации биотопа и развитии серьезных инфекционных процессов [1]. В основе молекулярного механизма бактериальной адгезии лежит взаимодействие патогенассоциированных молекулярных структур лигандов бактерий с образраспознающими рецепторами (pattern recognition receptors–PRR), которые рассматриваются как носители эволюционной памяти многоклеточных

\* - адресат для переписки

микроорганизмов о “своем” и “чужом”. Ключевым элементом распознавания “чужого” системой клеток врожденного иммунитета являются Toll-подобные рецепторы, экспрессируемые на их поверхности [2, 3]. Однако, распознавание патогена хотя и запускает факторы врожденного иммунитета, чаще всего не может радикально противостоять развитию инфекционного процесса. Для предотвращения развития инфекции необходимо прервать взаимодействие патогена и клеток-мишеней.

Механизмы создания препятствий при установлении взаимодействия между бактериями и клетками разнообразны, наиболее известный - конкуренция за места связывания на клеточных поверхностях [4]. С этой целью исследуются природные и синтетические аналоги клеточных рецепторов и компонентов тканевых жидкостей [5] - белки и гликопротеины плазмы крови [6], гликопептиды и олигосахариды [7], полисахариды [8], антиадгезивные антитела [9]. В литературе также имеются данные об антиадгезивном действии экзогенных протеолитических ферментов, прерывающих адгезию микроорганизмов, но не обладающих антибактериальным действием [10].

Ранее мы показали снижение адгезии *C. diphtheriae* к буккальному эпителию с помощью 1,3;1,6- $\beta$ -D-глюканов из водоросли *Laminaria cichorioides*, лишайника *Umbilicaria rossica*, клеточных клеток дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, а также фукоиданов из бурых водорослей *L. cichorioides*, *L. japonica* и *Fucus evanescens* [11].

Целью настоящей работы явилось исследование возможности ингибирования адгезии *C. diphtheriae* к эпителиоцитам гликозид гидролазами из морских гидробионтов. Использование ферментов, деградирующих углеводы, для блокирования адгезии определяется возможностью изменения структуры углеводов, экспрессированных на поверхности эукариотических клеток или бактерий.

**МЕТОДИКА.** В работе использовали  $\alpha$ -галактозидазу из морской бактерии *Pseudoalteromonas sp.* КММ 701 [12]; суммарный препарат ферментов и  $\beta$ -1,3-глюканазу из морского гриба *Chaetomium indicum* [13]; суммарный препарат ферментов и  $\beta$ -1,3-глюканазу из моллюска *Littorina kurila* [14], а также суммарный препарат ферментов из кристаллического стебелька двустворчатого моллюска *Spisula sachalinensis* [15]. Моллюски собраны в заливе Посьета, расположенного в северо-восточной части Японского моря.

Для определения активности ферментов, катализирующих гидролиз полисахаридов, использовали следующие субстраты: ламинаран, выделенный из бурой водоросли *Laminaria cichorioides* [16], фукоидан, выделенный из бурой водоросли *Fucus evanescens* [16], пустулан, выделенный из лишайника *Umbilicaria rossica* [17], коммерческие полисахариды: КМ-целлюлоза, агар (“Sigma”, США), амилопектин (“Реахим”, Россия).

Для определения активности гликозидаз использовали следующие коммерческие синтетические хромогенные гликозиды: *Np*- $\alpha$ -D-галактопиранозид, *Np*- $\alpha$ -D-маннопиранозид, *Np*- $\beta$ -D-глюкопиранозид, *Np*- $\alpha$ -L-фукопиранозид, *Np*- $\beta$ -D-галактопиранозид, *Np*- $\alpha$ -NAc-галактозаминид, *Np*- $\beta$ -NAc-глюкозаминид, *Np*- $\beta$ -ксилопиранозид, *Np*- $\alpha$ -D-глюкопиранозид, *Np*- $\beta$ -ксилопиранозид (“Sigma”).

В качестве модели для определения адгезивной активности и возможности её ингибирования использовали клетки эпителия полости рта человека (группа крови В(III)).

Тест-культура: токсикогенный штамм № 1129 *C. diphtheriae*, v. *gravis*, выделенный от больного дифтерией.

#### *Выделение и очистка ферментов.*

Культуральную жидкость морского гриба *Ch. indicum*, содержащую внеклеточные ферменты, концентрировали с помощью ультрафильтрации на мембране РМ-30 (“Millipore”, USA), подвергали диализу против 0,01 М натрий фосфатного буфера рН 5,2 и хроматографировали на колонке с КМ-целлюлозой (2,0×14 см, 0-0,5 М, 800 мл). Фракции, содержащие  $\beta$ -1,3-глюканазную активность объединяли, концентрировали в 5 раз с помощью ультрафильтрации на той же мембране, вновь подвергали диализу и рехроматографировали на колонке

с КМ-целлюлозой. Единицы активности сопутствующих гликозид гидролаз указаны в таблице 1. Очистку  $\beta$ -1,3-глюканазы до гомогенного состояния проводили далее в соответствии с процедурой, описанной ранее [13].

Таблица 1. Активность гликозид гидролаз суммарных препаратов и высокоочищенных ферментов морского гриба *Chaetomium indicum*, гепатопанкреаса *Litorina kurila* и экстракта кристаллического стебелька двустворчатого моллюска *Spisula sachalinensis*.

Фермент	Субстрат	Активность, мкмоль/мин, в 1 мл раствора фермента					
		<i>Ch. indicum</i>		<i>L. kurila</i>		<i>S. sachalinensis</i>	
		Сум.	Оч.	Сум.	Оч.	Сум.	Оч.
Фукоиданаза	фукоидан из <i>F. evanescens</i>	0	0	0,001	0	0	0
1,3- $\beta$ -D-глюканаза	ламинаран из <i>L. cichorioides</i>	0,83	3,47	0,59	17,1	6,94	0
Амилаза	амилопектин	0,15	0	0,20	0	10,41	0
Целлюлаза	КМ-целлюлоза	0,06	0	0,26	0	4,16	0
Агараза	агар	0	0	0,02	0	0	0
Пустуланаза	1,6- $\beta$ -D-глюкан	0	0	0,06	0	0,17	0
$\beta$ -Галактозидаза	<i>Np</i> - $\beta$ -D-Gal	0,00 2	0	0,19	0	н.о.	0
$\beta$ -Глюкозидаза	<i>Np</i> - $\beta$ -D-Glc	0,03	0	0,19	0	следы	0
$\beta$ -NAc-Глюкозаминидаза	<i>Np</i> - $\beta$ -D-NAc-Glc	0	0	н.о.	0	н.о.	0
$\beta$ -Ксилозидаза	<i>Np</i> - $\beta$ -D-Xyl	н.о.	н.о.	н.о.	0	0	0
$\alpha$ -Маннозидаза	<i>Np</i> - $\alpha$ -D-Man	0	0	0,06	0	0	0
$\alpha$ -Фукозидаза	<i>Np</i> - $\alpha$ -L-Fuc	н.о.	н.о.	0,07	0	0	0
$\alpha$ -Глюкозидаза	<i>Np</i> - $\alpha$ -D-Glc	н.о.	н.о.	н.о.	0	0	0
$\alpha$ -NAc-Галактозаминидаза	<i>Np</i> - $\alpha$ -D-NAc-Gal	0	0	н.о.	0	0	0
$\alpha$ -Галактозидаза	<i>Np</i> - $\alpha$ -D-Gal	н.о.	н.о.	н.о.	0	0	3,20

Печень моллюска *L. kurila* (150 г) гомогенизировали и экстрагировали водным раствором 0,2 М натрий ацетатного буфера, pH 5,4 (1:1). Нерастворимый материал удаляли центрифугированием (9000 g в течении 20 мин при 1°C). Супернатант смешивали с 500 мл DEAE – целлюлозы и помещали на фильтр Шотта (9×12 см). Белок элюировали ступенчатым градиентом NaCl, фракции, содержащие  $\beta$ -1,3-глюканазную активность, объединяли, концентрировали с помощью ультрафильтрации на мембране. Очистку  $\beta$ -1,3-глюканазы до гомогенного состояния проводили далее в соответствии с процедурой, описанной ранее [14].

Кристаллический стебелек морского моллюска *S. sachalinensis* гомогенизировали в 0,025 М натрий-сукцинатном буфере, pH 5,2. Полученный гомогенат центрифугировали при 9000 g в течение 20 мин, нерастворимую часть гомогената отбрасывали, а супернатант освобождали от низкомолекулярных примесей с помощью гельфильтрации на колонке с G-25 (Pharmacia, Швеция). Фракции, содержащие  $\beta$ -1,3-глюканазную активность объединяли, концентрировали с помощью ультрафильтрации на мембране.

$\alpha$ -Галактозидазу выделяли из биомассы морской бактерии *Pseudoalteromonas sp.* КММ 701 согласно процедуре, описанной ранее [12].

Активность ферментов, катализирующих гидролиз полисахаридов регистрировали по нарастанию количества восстанавливающих сахаров по методу Нельсона. За единицу активности принимали количество фермента,

## ДЕЙСТВИЕ ГЛИКОЗИД-ГИДРОЛАЗ НА АДГЕЗИЮ *C. DIPHTHERIAE* К ЭПИТЕЛИЮ

катализирующее образование 1 мкмольа восстанавливающих сахаров за 1 мин при 37°C и оптимальных для каждого фермента pH. Количество восстанавливающих сахаров определяли с помощью калибровочных графиков, используя в качестве стандартов соответствующие моносахариды.

Активность гликозидаз регистрировали по выделению *n*-нитрофенола, используя в качестве субстрата соответствующие *n*-нитрофенилгликозиды. Концентрацию *n*-нитрофенола, выделившегося в ходе ферментативной реакции, определяли спектрофото-метрически при 400 нм ( $18300 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ). За единицу активности принимали такое количество фермента, которое катализировало образование 1 мкмольа *n*-нитрофенола в минуту.

### Подготовка клеток эпителия.

Искусственную колонизацию буккальных эпителиоцитов *C. diphtheriae* определяли по методу [18] в собственной модификации.

Клетки буккального эпителия получали утром натошак, после тщательного полоскания полости рта, путем соскоба со слизистой оболочки щёк стерильной ложечкой. Материал помещали в пробирку с изотоническим 0,1 М ФСБ (pH 7,2), трижды отмывали центрифугированием при 2000 g в течение 10 мин и готовили взвесь в концентрации  $3 \times 10^5$  кл/мл.

### Исследование антиадгезивной активности ферментных препаратов.

Культуры токсикогенного штамма *C. diphtheriae* № 1129, v. *gravis*, выделенного от больного дифтерией, выращивали на 20% сывороточном агаре Хоттингера. Взвесь микроорганизмов, приготовленную на изотоническом 0,1 М ФСБ (pH 7,2–7,4) по оптическому стандарту ГИСК им. Л.А. Тарасевича в концентрации  $10^9$  кл/мл, и растворы исследуемых препаратов ферментов объединяли с суспензиями эпителиальных клеток и/или клеток микроорганизмов в следующем порядке:

1. *Контроль*: 0,2 мл эпителиальных клеток ( $3 \times 10^5$ /мл) соединяли с 0,2 мл взвеси микроорганизмов ( $10^9$ /мл), инкубировали 30 минут при 37°C.

2. *Обработка клеток ферментами*: 0,2 мл эпителиальных клеток ( $3 \times 10^5$ /мл) соединяли с 0,1 мл раствора исследуемого фермента, инкубировали 30 минут при 37°C, затем вносили 0,2 мл взвеси микроорганизмов ( $10^9$ /мл), вновь инкубировали 30 минут при 37°C.

3. *Обработка микроорганизмов ферментами*: 0,2 мл взвеси микроорганизмов ( $10^9$ /мл) соединяли с 0,1 мл раствора исследуемого фермента, инкубировали 30 минут при 37°C, затем добавляли 0,2 мл эпителиальных клеток ( $3 \times 10^5$ /мл), вновь инкубировали 30 минут при 37°C.

4. *Обработка ферментами микроорганизмов, предварительно адгезированных к клеткам эпителия*: 0,2 мл эпителиальных клеток ( $3 \times 10^5$ /мл) соединяли с 0,2 мл взвеси микроорганизмов ( $10^9$ /мл), инкубировали 30 минут при 37°C, затем добавляли 0,1 мл раствора исследуемого фермента, вновь инкубировали 30 минут при 37°C.

После окончания инкубирования эпителий трижды отмывали от неприкрепившихся микроорганизмов центрифугированием по 10 мин (2000 g) в изотоническом 0,1 М калий-натрий фосфатном буфере (ФСБ) pH 7,2–7,4. На предметном стекле готовили мазок, высушивали, фиксировали метанолом и окрашивали метиленовым синим Лёффлера. Препараты микроскопировали с масляной иммерсией. Просматривали не менее 50 эпителиоцитов с подсчетом числа адгезированных бактерий на каждом из них. Высчитывали средний показатель адгезии (СПА) – среднее количество бактерий, прикрепившихся к одной эпителиальной клетке. Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью пакета программ “Biostat”. Различия считали значимыми при  $p \leq 0,05$ .

**РЕЗУЛЬТАТЫ.** В таблице 1 представлены значения единиц активности гликозид гидролаз, содержащихся в 1 мл суммарного препарата (Сум.) морского гриба *Ch. indicum*, гепатопанкреаса *L. kurila* и кристаллического стебелька



двустворчатого моллюска *S. sachalinensis*, прошедших частичную очистку в соответствии с процедурами, указанными выше, а также высокоочищенных 1,3- $\beta$ -D-глюканаз (Оч.) из этих же источников.

При изучении подавления бактериальной адгезии исследуемыми ферментами предполагалась возможность воздействия как на лиганды бактерий, так и на рецепторы эпителиоцитов. Полученные результаты показывают, что все исследуемые ферменты обнаружили способность в той или иной степени прерывать адгезию *C. diphtheriae* на буккальном эпителии (табл. 2). Торможение адгезии было наиболее выраженным в случае обработки эпителиоцитов высокоочищенными ферментами морских гидробионтов по сравнению с суммарными препаратами ферментов. Максимальный эффект был получен в том случае, когда ферментами обрабатывали клетки с уже адгезированными микроорганизмами.

Таблица 2. Снижение адгезивной активности токсикогенного штамма *C. diphtheriae* (СПА) под действием ферментов морских гидробионтов.

Вариант опыта Фермент	I		II		III	
	X	p	X	p	X	p
Экстракт кристаллического стебелька <i>Spisula sachalinensis</i>	11,6 $\pm$ 0,6	0,013	6,4 $\pm$ 0,6	0,000	4,1 $\pm$ 0,8	0,000
$\beta$ -1,3-глюканаза из гепатопанкреаса морского моллюска <i>L. kurila</i>	9,9 $\pm$ 0,2	0,000	6,4 $\pm$ 0,3	0,000	4,4 $\pm$ 0,4	0,000
Суммарный препарат из гепатопанкреаса морского моллюска <i>Littorina kurila</i>	10,5 $\pm$ 0,6	0,008	10,6 $\pm$ 0,1	0,04	6,4 $\pm$ 0,1	0,000
Суммарный препарат из морского гриба <i>Chaetomium indicum</i>	9,9 $\pm$ 0,86	0,004	9,45 $\pm$ 0,9	0,08	4,2 $\pm$ 0,2	0,000
$\beta$ -1,3-глюканаза из гриба <i>Ch. indicum</i>	5,5 $\pm$ 0,3	0,000	8,5 $\pm$ 0,1	0,000	4,1 $\pm$ 0,6	0,000
$\alpha$ -галактозидаза из морской бактерии <i>Pseudoalteromonas sp.</i> KMM 701	6,0 $\pm$ 0,3	0,000	4,7 $\pm$ 0,2	0,000	2,1 $\pm$ 0,4	0,000
Контроль	14,7 $\pm$ 0,6		14,7 $\pm$ 0,6		14,7 $\pm$ 0,6	

Примечание: I - ферменты инкубированы с микроорганизмами; II ферменты инкубированы с клетками буккального эпителия; III - ферменты инкубированы с клетками буккального эпителия с адгезированными микроорганизмами; СПА - среднее количество бактерий, прикрепившихся к одной эпителиальной клетке; n=4. Результаты представлены в виде средней  $\pm$  ошибка средней величины.

**ОБСУЖДЕНИЕ.** Основой взаимодействия любых биологических систем и межклеточных коммуникаций служит лиганд-рецепторное узнавание [4]. Молекулярная структура лигандов бактерий и образраспознающих рецепторов эукариотических клеток представлена полимерами гликолипидной или гликопротеиновой природы, определяющих тропизм различных патогенов к своим клеткам-мишеням [2-4]. В качестве чувствительных структур, детектирующих определенные углеводные последовательности в олигосахаридах, которые являются специфическими лигандами в углевод-белковом взаимодействии, выступают доменные центры лектинов и ферментов [19]. Предположив, что деградация углеводов, экспрессированных на поверхности эукариотических клеток или бактерий, может изменять их структуру и, нарушая уникальность и специфичность лектин-углеводного связывания, препятствовать адгезионному контакту, мы исследовали влияние гликозидгидролаз из морских гидробионтов на способность *C. diphtheriae* адгезировать к клеткам буккального эпителия.

Лиганд–рецепторные взаимодействия *C. diphtheriae* с эукариотическими клетками изучались ранее [20], однако до сих пор природа факторов, ответственных за колонизацию дифтерийных бактерий, до конца не изучена. В 1976 году впервые были описаны фимбрии *C. diphtheria* - белковые образования в виде ворсинок (пилей), которые могут играть роль адгезинов [21], обеспечивающих колонизацию бактерий в организме человека. Недавние исследования также подтвердили способность *C. diphtheriae* адгезировать на фаренгиальном эпителии, связанную с микропилиями (фимбриями) SpaC типа, жестко закрепленными в клеточной стенке бактерий [22, 23]. В то же время Colombo и соавт. [24] установили, что *C. diphtheriae* экспрессируют и нефимбриальные лектин-подобные поверхностные белки, способные распознавать и связываться со специфическими распознающими рецепторами в составе гликоконъюгатов на поверхности эукариотических клеток, в том числе эритроцитов [24]. В качестве адгезинов *C. diphtheriae* рассматриваются концевые сахара гемагглютининов, гидрофобины и ферменты с трансгалактозилтрансферазной активностью [25]. На поверхности клеточной стенки *C. diphtheriae* идентифицированы также N-ацетилглюкозамин, N-ацетилгалактозамин, галактоза, манноза, сиаловая кислота, арабиноза, глюкоза [20].

Результаты, полученные нами при изучении влияния гликозидгидролаз из морских гидробионтов на адгезию *C. diphtheriae* к буккальному эпителию, демонстрируют возможность нарушения углеводных структур, экспрессированных на поверхности эпителиоцитов и бактерий.

Следует отметить, что инкубирование клеток и бактерий с ферментами проводилось в стандартных условиях – при 37°C, pH 7,2-7,4. Все исследуемые образцы 1,3-β-D-глюканаза из моллюсков имеют оптимумы действия при pH 5,0–6,0 [19, 20], глюканаза из морского гриба - при pH 4,4 и 5,6 [13], и только α-галактозидаза наиболее активна при физиологических значениях pH 7,3 [12]. Однако исследуемые 1,3-β-D-глюканазы из морских гидробионтов устойчивы в широком диапазоне pH, и при pH 7,2 сохраняют достаточно высокую активность. Исследуемые 1,3-β-D-глюканазы из морских гидробионтов инактивируются при температуре выше 45°C, а при температуре 37°C сохраняют активность в течение длительного времени [13, 14]. α-Галактозидаза, выделенная из морской бактерии *Pseudoalteromonas sp.* КММ 701, адаптированной к холоду, напротив, является ферментом термолабильным [12], но в течении 30-минутного выдерживания при 37°C сохраняет 20% активности [12], достаточной для того, чтобы воздействовать на углеводные структуры эпителия и/или бактерий.

Как было показано ранее [13], внеклеточная 1,3-β-D-глюканаза из морского гриба *Ch. indicum* эффективно катализирует гидролиз β-1,3-связей в глюканах по экзо-типу действия, с высокой скоростью отщепляя остатки глюкозы с невосстанавливающего конца молекул β-1,3-глюканов ламинарана и КМ-пахимана, и со значительно меньшей – ряда других высокомолекулярных глюканов со смешанным типом связи (дрожжевой глюкан, лихенан, зимозан). Суммарный препарат фермента из морского гриба *Ch. indicum* наряду с 1,3-β-D-глюканазой содержит амилазу, целлюлазу и β-D-глюкозидазу (табл. 1).

Комплекс ферментов из печени морского моллюска *L. kurila*, гидролизующих ламинаран, содержит две О-гликозидгидролазы различного типа действия. Первая - эндо-1,3-β-D-глюканаза G-I с узкой субстратной специфичностью, - катализирует гидролиз внутренних β-1,3-связей в смешанных 1,3;1,6- и 1,3;1,4-β-D-глюканах с образованием глюкозы и глюкоолигосахаридов. Вторая - β-глюкозидаза G-II, - гидролизует ламинаран до глюкозы и с высокой скоростью расщепляет *n*-нитрофенилглюкозид. В суммарном препарате из морского моллюска *S. sachalinensis* присутствуют, главным образом, высокоактивные эндо-1,3-β-D-глюканазы, амилазы и целлюлазы [15] (табл. 1).

По результатам действия ферментов на клетки *C. diphtheriae* можно предположить, что глюканазы морского гриба модифицируют структуры лигандов

бактерий углеводной природы, имеющих на невосстанавливаемом конце 1,3-β-связанные остатки глюкозы.

Максимальный эффект, полученный в том случае, когда ферментами обрабатывали клетки с уже прикрепившимися микроорганизмами, может быть обусловлен суммированием воздействия на углеводные структуры как бактерий, так и эпителиоцитов. Подобный эффект описан для протеолитических ферментов, действие которых приводит к нарушению уже сформированных колоний микроорганизмов, образующих биопленку [10].

Среди исследованных ферментов α-галактозидаза, выделенная из морской бактерии *Pseudoalteromonas sp.* КММ 701, наиболее эффективно снижала адгезию *C. diphtheriae* при всех вариантах обработки (табл. 2). Ранее было показано, что эта α-галактозидаза способна катализировать отщепление α-связанных остатков галактозы от мелибиозы (Gal1,6Glc), дисахарида Gal1,3Glc и трисахарида Galα1,3(Fucα1,2)Gal, а также от невосстанавливающего конца углеводной составляющей гликоконъюгатов групповых веществ и антигенных детерминант эритроцитов крови группы В(III). По эффективности действия на трисахарид Galα1,3(Fucα1,2)Gal данная α-галактозидаза в 4 раза активнее α-галактозидазы из зеленых бобов кофе [12].

Известно, что буккальный эпителий, являясь частью мукозальной системы, сохраняет элементы её активной позиции во взаимоотношениях со стимулами, исходящими из внешней и внутренней среды. На клетках буккального эпителия идентифицированы различные варианты АВН изотипов углеводных цепей, соответствующие АВН антигенам групп крови эритроцитов индивидуума [26]. Принимая во внимание способность АВН антигенов участвовать в различных межклеточных взаимодействиях и взаимодействиях клеток с матриксом, результаты, демонстрирующие высокую антиадгезивную активность α-галактозидазы в нашем случае (использование эпителиоцитов донора с В (III) группой крови), могут быть обусловлены, в числе прочих возможных факторов, специфичностью фермента, обеспечивающей нарушение углеводных структур, входящих в состав В-антигенов.

Таким образом, в результате проведенных исследований показана возможность снижения адгезии *C. diphtheriae* гликозидгидролазами из морских гидробионтов. Полученные результаты являются обнадеживающими с точки зрения дальнейшего изучения ферментов морских гидробионтов в качестве антиадгезинов.

Работа выполнена в рамках интеграционных проектов СО РАМН-ДВО РАН №№ 05-II-СМ-05-007, 06-II-СМ-05-004, 06-III-В-05-127, а также поддержана грантами Российского фонда фундаментальных исследований № 06-04-48540-а, 08-04-00289а, 07-04-90010 и программой РАН “Молекулярная и клеточная биология”.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Бухарин О.В., Лобанова Е.С., Немцева Н.В., Черкасов С.В. (2007) Ассоциативный симбиоз. Екатеринбург, 260.
2. Семенов Б.Ф., Зверев В.В. (2007) Микробиол. Ж., **4**, 93-100.
3. Байракова А.Л., Воропаева Е.А., Афанасьев С.С., Алешкин В.А. (2008) Вестник Российской АМН, **1**, 45-54.
4. Езенчук Ю.В. (1985) Патогенность как функция биомолекул. М., 236.
5. Matrosovich M.N. (1989) FEBS Letters, **252**, 1-4.
6. Lammler C., Frede C. (1989) Zbl. Bacteriol. Hyg., **271**, 321-329.
7. Neeser J.-R., Wursch P. (1985) Patent US № 4939123.
8. Устюжанина Н.Е., Гербст А.Г., Хатунцева Е.А., Нифантьев Н.Э. (2003) Актуальные проблемы органической химии. Новосибирск, Д34.

9. Kelly C.G., Younson J.S. (2000) *Exper. Opin. Investig. Drugs*, **9**, 1711-1721.
10. Тең В.В., Кнорринг Г.Ю., Артеменко Н.К., Заславская Н.В., Артеменко К.Л. (2004) *Антибиотики и химиотерапия*, **12**, 46-50.
11. Макаренкова И.Д., Запорожец Т.С., Беседнова Н.Н., Елякова Л.А., Звягинцева Т.Н., Потапов В.А., Котова И.В. (1999) *Антибиотики и химиотерапия*, **3**, 11-14.
12. Бакунина И.Ю., Сова В.В., Недашковская О.И., Кульман Р.А., Лихошерстов Л.М., Мартынова М.И., Михайлов В.В., Елякова Л.А. (1998) *Биохимия*, **63**, 1420-1427.
13. Burtseva Yu.V., Verigina N.S., Sova V.V., Pivkin M.V., Zvyagintseva T.N. (2003) *Mar. Biothechnol*, **5**, 349-359.
14. Pesentseva M.S., Kusaykin M.I., Anastyuk S.D., Sova V.V., Zvyagintseva T.N. (2008) *Carbohydr. Res.*, in press.
15. Sova V.V., Elyakova L.A., Vaskovsky V.E. (1970) *Biochem. Biophys. Acta*, **212**, 111-115.
16. Zvyagintseva T.N., Shevchenko N.M., Popivnich I.B., Isakov V.V., Scobun A.S., Sundukova E.V., Elyakova L.A. (1999) *Carbohydr. Res.*, **322**, 32-39.
17. Zvyagintseva, T.N., Elyakova, L.A., Sundukova, E.V., Mishchenko N.P. (1986) *Byull. Izobret.*, **16**, USSR Inventor's Certificate 1227199.
18. Брилис В.И., Брилене Т.А., Ленцнер Х.П., Ленцнер А.А. (1986) *Лаб. дело*, №4, 210-212.
19. Игнатов В.В. (1997) *Соросовский образов. журн.*, №2, 14-20.
20. Карась С.Р., Касилова Д.Я., Костюкова Н.Н. (1991) *Журн. микробиол.*, **5**, 17-19.
21. Yanagawa R., Honda E. (1976) *Infect. Immun.*, **13**, 1293-1295.
22. Mandlik A., Swierczynski A., Das A., Ton-That H. (2007) *Mol. Microbiol.*, **64**, 111-124.
23. Ton-That H., Schneewind O. (2003) *Mol. Microbiol.*, **50**, 4, 1429-1438.
24. Colombo A.V., Hirata R., Souza C.M.R., Monteiro-Leal L.H., Previato J.O., Formiga L.C.D., Andrade A.F.B., Mattos-Guaraldi (2001) *Microbiol. Lett.* **197**, 235-239.
25. Mattos-Guaraldi A.L., Formiga L.C., Pereira G.A. (2000) *Microbes and Infection.*, **12**, 1507-1512.
26. Bryne M., Lilleholt S., Thrane P.S., Koppang H.S., Dabelsteen E. (1993) *Histochem. J.*, **25**, 339-347.

Поступила: 24. 06. 2008.



INHIBITION OF ADHERENCE OF *CORYNEBACTERIUM DIPHTHERIAE* TO HUMAN  
BUCCAL EPITELIUM BY GLYCOSIDE HYDROLASES OF MARINE HYDROBIONTES

T.S. Zaporozhets<sup>1</sup>, I.D. Makarenkova<sup>1</sup>, I.Y. Bakunina<sup>2</sup>, Y.V. Burtseva<sup>2</sup>, M.I. Kusaykin<sup>2</sup>,  
L.A. Balabanova<sup>2</sup>, N.N. Besednova<sup>1</sup>, T.N. Zvyagintseva<sup>2</sup>, V.A. Rasskazov<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Research Institute of Epidemiology and Microbiology, the Russian Academy of Medical Sciences, 1,  
Selskaya str., Vladivostok, 690087 Russia; tel.: (3243)44-24-46; fax: (4232)44-11-47;  
e-mail: niem\_vl@mail.ru

<sup>2</sup>Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, Far-Eastern Branch of the Russian Academy of Sciences,  
Vladivostok, 690022 Russia; tel.: (4232)310305; e-mail: balaban@mail.ru

A possibility of adhesion inhibition of *Corynebacterium diphtheriae* to human buccal epithelium by glycoside hydrolases of marine hydrobiontes was investigated using  $\alpha$ -galactosidase from marine bacterium *Pseudoalteromonas* sp. KMM 701, total enzyme preparation and  $\beta$ -1,3-glucanase from marine fungi *Chaetomium*, total enzyme preparation and  $\beta$ -1,3-glucanase from marine mollusk *Littorina kurila*, and total enzyme preparation from crystalline style of marine mollusk *Spisula sachalinensis* were used. The enzymes were added to test-tubes containing buccal epithelial cells and/or the toxigenic bacterial strain *C. diphtheriae* №1129, v. *gravis*.

All the investigated enzymes were able to abort *C. diphtheriae* adherence to human buccal epithelocytes. Inhibition of adhesion was more pronounced in the case of treatment of epithelocytes with highly purified enzymes of marine hydrobiontes in comparison with total enzyme preparations. The significant inhibition of *C. diphtheriae* adhesion was observed when the enzymes were added to the epithelocytes with the attached microorganisms.

The results obtained show that glycoside hydrolases of marine hydrobiontes degrade any carbohydrates expressed on cell surface of bacterium or human buccal epithelocytes, impair unique lectin-carbohydrate interaction and prevent the adhesion.

**Key words:** *C. diphtheriae*, adherence, glycoside hydrolases of marine hydrobiontes.