

В.И. Дубровина, Г.Б. Мухтургин, С.В. Балахонов, С.А. Витязева, Т.П. Старовойтова,
Т.А. Иванова, Ж.А. Коновалова, А.М. Владимирова

ИЗУЧЕНИЕ ИММУНОФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ШТАММОВ ЧУМНОГО МИКРОБА С РАЗЛИЧНЫМ ПЛАЗМИДНЫМ СОСТАВОМ

ФКУЗ Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора, Иркутск

В статье представлены данные о влиянии плазмидного состава чумного микроба на его адгезивные свойства и фагоцитарную активность перитонеальных макрофагов в условиях *in vitro*. Показано, что штаммы чумного микроба разных подвидов, отличающиеся по плазмидному профилю, в частности отсутствию одной из плазмид (pYP, pYV), обладают низкой адгезивной активностью и способствуют повышению поглотительной способности фагоцитов лабораторных животных.

Ключевые слова: возбудитель чумы, адгезия, фагоциты

STUDYING OF IMMUNOPHYSIOLOGICAL PROPERTIES OF *YERSINIA PESTIS* STRAINS WITH VARIOUS PLASMID COMPOSITION

V.I. Dubrovina, G.B. Mukhturgin, S.V. Balakhonov, S.V. Vityazeva, T.P. Starovoytova,
T.A. Ivanova, Zh.A. Konovalova, A.M. Vladimirova

Irkutsk Antiplague Research Institute of Siberia and Far East of Rospotrebnadzor, Irkutsk, Russia

Data of *Yersinia pestis* plasmid structure influence on its adhesive properties and phagocytic activity of peritoneal macrophages *in vitro* are represented. It is shown that *Y. pestis* strains of diverse subspecies differing by a plasmid profile, particularly by one of the plasmids (pYP, pYV) lacking, possess low adhesive activity and promote the increase of laboratory animal phagocyte absorbing capacity.

Key words: *Yersinia pestis*, adhesion, phagocyte

Актуальным направлением в изучении патогенеза чумы является исследование особенностей иммунофизиологических процессов и механизмов адаптации, возникающих у возбудителя чумы *Yersinia pestis* с различным плазмидным составом при взаимодействии с организмом хозяина. Одним из признаков вирулентности чумного микроба является способность бактериальных клеток при помощи ряда белков (адгезин, инвазин, Ail, YadA, YadB, YadC, Pla, and pN 6) фиксироваться на поверхности эритроцитов и проникать внутрь фагоцитов с последующей дезорганизацией их мембран, вызывая, как следствие, уменьшение кислородной емкости крови и интоксикацию [1, 2, 5–7, 14]. При инфекционном процессе, вызванном *Y. pestis*, происходит нарушение окислительного фосфорилирования и транспорта электронов в ферментной цепи за счет торможения энзиматической активности дегидрогеназ. Активность ферментов гликолиза (гексокиназы, фосfogексоизомеразы, альдолазы, глицеральдегид-3-фосфат-дегидрогеназы) у чумного микроба значительно выше активности глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (Г6ФДГ), 6-фосфоглюконат-дегидрогеназы и транскетолазы. Из перечисленных энзимов апоптомического пути наиболее низкой активностью обладает Г6ФДГ [8]. Антимикробный потенциал фагоцитирующих клеток, способный определять развитие типовых патологических процессов, является физиологической основой клеточной защиты макроорганизма от возбудителя чумы. В настоящее время фагоцитарная система макроорганизма рассматривается как важнейший

эффектор структурного гомеостаза, направленный на уничтожение микробов [1, 8].

В связи с этим, проведение экспериментальных исследований по установлению патогенных эффектов возбудителя на макроорганизм является актуальной проблемой патологической физиологии, поскольку большая часть патогенного потенциала чумного микроба, циркулирующего в природных очагах, для людей остается неизвестной.

Цель работы – оценить адгезивные свойства штаммов чумного микроба с разным плазмидным составом и их влияние на поглотительную способность фагоцитов в условиях *in vitro*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали 5 штаммов *Y. pestis* subspecies *altaica* и *Y. pestis* subsp. *pestis* из коллекции музея ФКУЗ Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора (табл. 1).

Штаммы чумного микроба культивировали на агаре Хоттингера pH 7,2 при 28 °C 48 часов, смывали 0,9 % ЗФР. Бактериальную взвесь ($1 \cdot 10^9$ КОЕ/мл по ОСО 10 ед.) раститровывали до концентрации $1 \cdot 10^7$ КОЕ/мл. Работа с материалом, зараженным ПБА I–II группы патогенности, проводилась в соответствии с Санитарными правилами «Безопасность работы с микроорганизмами I–II группы патогенности (опасности)» СП 1.3.1285-03.

Эксперименты выполнены на 60 морских свинках (200–250 г) и 10 беспородных белых мышах (18–20 г) обоих полов. Животных выводили из эксперимента в соответствии с «Правила лабораторной практики»,

Таблица 1

Характеристика тестируемых штаммов чумного микроба

Штамм	Место выделения	Плазмидный состав	Вирулентность для белых мышей (LD ₅₀), м.к.
<i>Y. pestis</i> subsp. <i>pestis</i> И-2638	Тувинский природный очаг чумы	pYP ⁺ pYV ⁺ pTP33 ⁺ pYT ⁺	10/высоковирулентный
<i>Y. pestis</i> subsp. <i>pestis</i> И-3479	Иркутский противочумный институт	pYP ⁺ pYV ⁺ pTP33 ⁺ pYT ⁺	Авирулентный
<i>Y. pestis</i> subsp. <i>pestis</i> И-3480	Иркутский противочумный институт	pYP ⁺ pYV ⁺ pTP33 ⁺ pYT ⁺	Авирулентный
<i>Y. pestis</i> subsp. <i>altaica</i> И-2359	Горно-алтайский природный очаг чумы	pYP ⁺ pYV ⁺ pYT ⁺	4·10 ⁴ /слабовирулентный
<i>Y. pestis</i> EV НИИЭГ	о. Мадагаскар	pYP ⁺ pYV ⁺ pYT ⁺	3·10 ⁸ /остаточная вирулентность

утвержденных Приказом Минздрава РФ № 267 от 19.06.2003 г.; Принципы надлежащей лабораторной практики (Национальный стандарт РФ ГОСТ Р 53434-2009).

Материалом для получения эритроцитов служила венозная кровь клинически здоровых лабораторных животных. Адгезивную активность выявляли по методу В.И. Брилис с соавт. (1986) [6] в собственной модификации [9] по коэффициенту адгезии (КА). Фагоцитарную активность перитонеальных макрофагов (ПМ) определяли по поглотительной способности фагоцитов (фагоцитарный индекс поглощения, ФИП, %), примированных чумным микробом с разным плазмидным составом в течение 30 минут при 37 °С. Контролем служили интактные фагоциты. Анализ полученных результатов осуществляли стандартными статистическими методами и выражали как среднее (М) и стандартное отклонение (s). Для сравнения средних из выборок использовали U-критерий Манна – Уитни. Для выяснения общего характера распределения вычисляли показатели асимметрии и эксцесса. Различия считали достоверными при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Показано, что чумной микроб, независимо от его фенотипических свойств, проявляет высокую способность реагировать с эритроцитами белых мышей. Максимальные значения коэффициента адгезии (табл. 2) зарегистрированы для штамма *Y. pestis* subsp. *pestis* И-2638. У штамма *Y. pestis* subsp. *altaica* И-2359, а также у *Y. pestis* subsp. *pestis* И-3479, и *Y. pestis* subsp. *pestis* И-3480 показатели адгезивной способности в отношении эритроцитов белых мышей были ниже по сравнению с *Y. pestis* И-2638 (в 4,3; 6,6 и 8,4 раза, соответственно).

Таблица 2

Значения коэффициента адгезии

Штаммы	Значение КА (%)
<i>Y. pestis</i> EV	15,2 ± 0,8
<i>Y. pestis</i> subsp. <i>altaica</i> И-2359	21,0 ± 0,9
<i>Y. pestis</i> subsp. <i>pestis</i> И-2638	92,0 ± 2,3
<i>Y. pestis</i> subsp. <i>pestis</i> И-3479	14,0 ± 0,7
<i>Y. pestis</i> subsp. <i>pestis</i> И-3480	11,0 ± 1,7

Возбудитель чумы, циркулирующий на территории природных очагов Сибири, отличается по плазмидному составу, питательным потребностям, ферментативной активности и вирулентности для различных видов диких и лабораторных животных. Так, имеются сведения о различиях биохимических свойств у штаммов алтайского и основного подвидов [3, 4]. Для их дифференциации рядом исследователей предложен тест для определения Г6ФДГ активности чумного микроба [13].

Известно, что чумной микроб, в зависимости от его фенотипических свойств, обладает разным уровнем Г6ФДГ активности [10]. Так, у *Y. pestis* subsp. *pestis* И-2638 содержание этого фермента в среднем в 2,0–2,3 раза ниже по сравнению с остальными клетками чумного микроба ($p = 0,017$), взятых в эксперимент. У двух изогенных вариантов вирулентного штамма *Y. pestis* subsp. *pestis* И-2638 – *Y. pestis* subsp. *pestis* И-3479 и *Y. pestis* subsp. *pestis* И-3480 и *Y. pestis* subsp. *altaica* существенных различий Г6ФДГ активности не выявлено (табл. 3).

Таблица 3

Глюкозо-6-фосфатдегидрогеназная активность *Y. pestis*

Штаммы	Уровень активности Г6ФДГ
<i>Y. pestis</i> subsp. <i>altaica</i> И-2359	0,34 ± 0,90
<i>Y. pestis</i> subsp. <i>pestis</i> И-2638	0,15 ± 2,30
<i>Y. pestis</i> subsp. <i>pestis</i> И-3479	0,30 ± 0,68
<i>Y. pestis</i> subsp. <i>pestis</i> И-3480	0,32 ± 1,73

Результаты проведенного эксперимента свидетельствуют о наличии корреляционной связи между каталитической способностью Г6ФДГ чумного микроба и его адгезивной активностью ($r = -0,85$). У вирулентного штамма *Y. pestis* И-2638 при наличии низкой активности Г6ФДГ отмечается высокая адгезивная способность. Показано, что при повышении показателей Г6ФДГ происходит заметное снижение способности чумного микроба фиксироваться на поверхности эритроцита. Предположительно, изменения в адгезивных и ферментативных свойствах *Y. pestis* связаны с особенностями его плазмидного профиля. Результаты, полученные в ходе исследования, подтверждают данные других авторов [13] о низкой способности вирулентных

штаммов экспрессировать активную форму Г6ФДГ из-за миссенс-мутаций (замена пролина на серин в аминокпозиции 155).

Установлена высокая поглотительная способность (ФИП: $M = 9,4$; $s = 0,4$) фагоцитов морской свинки (табл. 4) в отношении *Y. pestis* subsp. *altaica* И-2359 (pYP⁺pYV⁺pYT⁺). Наименьшие значения индекса поглощения ($M = 4,7$; $s = 0,5$) выявлены у фагоцитов, примированных *Y. pestis* subsp. *pestis* И-2638 (pYP⁺pYV⁺pTP33⁺pYT⁺), что, на наш взгляд, может быть связано с наличием в геноме штамма, выделенного в Тувинском природном очаге чумы, плазмиды pTP33, опосредованно влияющей на ингибирование механизмов фагоцитоза. В настоящее время значение этой криптической плазмиды в определении биологических свойств чумного микроба до конца не выяснено. Высказано предположение, что плаزمида pTP33 является продуктом рекомбинационного контегративного взаимодействия плазмид pYP и pYT *Y. pestis* [4].

Таблица 4
Поглотительная способность (ФИП) фагоцитов морской свинки

Штаммы	ФИП (%)
<i>Y. pestis</i> EV	6,81 ± 0,8
<i>Y. pestis</i> subsp. <i>altaica</i> И-2359	9,21 ± 0,9
<i>Y. pestis</i> subsp. <i>pestis</i> И-2638	4,71 ± 0,5
<i>Y. pestis</i> subsp. <i>pestis</i> И-3479	7,11 ± 0,3
<i>Y. pestis</i> subsp. <i>pestis</i> И-3480	7,63 ± 0,5

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результатах проведенных опытов показаны различия в адгезивной активности штаммов чумного микроба с разным плазмидным составом, выделенных в Горно-Алтайском и Тувинском природных очагах. Штаммы чумного микроба разных подвидов, отличающиеся по плазмидному профилю, в частности отсутствию одной из плазмид (pYP, pYV), обладают низкой адгезивной активностью и способствуют повышению поглотительной способности фагоцитов лабораторных животных. Можно предположить, что важную роль в этих процессах играет плазмиды кальцийзависимости, которая может обуславливать способность бактерий вирулентных штаммов ингибировать активность клеток иммунофагоцитарной системы. Вероятно, плазмиды пестициногенности также может опосредовано участвовать в этом процессе. Полученные в ходе исследования данные указывают, что штаммы *Y. pestis* И-3479, *Y. pestis* И-3480, утратившие плазмиды pYP и pYV, обладают низкими показателями адгезивной активности, имеют высокие показатели активности Г6ФДГ по сравнению с *Y. pestis* subsp. *pestis* И-2638 (pYP⁺pYV⁺pTP33⁺pYT⁺).

Выявленные в ходе экспериментов данные о различиях в поглотительной способности ПМ в отношении *Y. pestis* subsp. *altaica* И-2359, *Y. pestis* subsp. *pestis* И-3479, *Y. pestis* subsp. *pestis* И-3480 по сравнению с *Y. pestis* subsp. *pestis* И-2638, вероятно

обусловлены их плазмидным профилем, в частности наличием плазмиды pYV или pTP33.

Данное обстоятельство, на наш взгляд, может опосредованно влиять на ингибирование механизмов фагоцитоза.

Полученные в ходе экспериментов данные могут быть использованы при изучении молекулярно-генетических основ патогенеза инфекционного процесса, направлений его развития и определения действия эффективных форм вакцинных препаратов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Анисимов А.П. Факторы *Yersinia pestis*, обеспечивающие циркуляцию и сохранение возбудителя чумы в экосистемах природных очагов // Журн. молекул. генетика, микробиология и вирусология. – 2002. – № 3. – С. 3–4.
2. Афанасьева Г.А., Чеснокова Н.П., Дальвадянц С.М., Кутырев В.В. Эндотоксин *Yersinia pestis*: особенности структуры, рецепции и механизмов индукции цитопатогенных эффектов (обзор) // Проблемы особо опасных инфекций – Саратов – 2008. – № 4 (98) – С. 43–48.
3. Балахонов С.В. Геномные маркеры возбудителей чумы, псевдотуберкулеза, холеры, бруцеллеза: дисс. ... докт. мед. наук. – Саратов, 2000. – 263 с.
4. Балахонов С.В., Вержуцкий Д.Б., Корзун В.М. и др. Современное состояние природных очагов чумы Сибири // Журнал инфекционной патологии. – 2009. – Т. 16, № 3. – С. 16–20.
5. Бахтеева И.В. Исследование функциональной активности рН 6 антигена *Yersinia pestis* с помощью наборов изогенных мутантов: автореф. дис. ... канд. мед. наук. – М., 2008. – 28 с.
6. Брилис В.И. и др. Методика изучения адгезивного процесса микроорганизмов // Лаб. дело. – 1986. – № 4. – С. 210–212.
7. Варивода Т.Ю., Каграманов В.С. Изучение влияния антигенов чумного микроба на возникновение гипоксического состояния у экспериментальных животных // Сборник материалов международной научной конференции. Проблемы биологической и экологической безопасности. 22–25 мая. – 2000. – Оболенск. – С. 23–24.
8. Домарадский И.В. Чума: современное состояние, гипотезы, проблемы. – Саратов: Изд-во Саратовского медицинского ин-та, 1993. – 130 с.
9. Иванова Т.А. и др. Методические рекомендации по использованию показателей адгезивной активности *Yersinia pestis* для оценки вирулентности. – Иркутск, 2012. – 8 с.
10. Коновалова Ж.А., Мухтургин Г.Б., Дубровина В.И., Иванова Т.А. и др. Активность глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы чумного микроба *Yersinia pestis* с разным плазмидным профилем и взаимодействующих с ним перитонеальных макрофагов морских свинок // Известия Иркутского госуниверситета. – 2011. – Серия «Биология. Экология». – Т. 4, Вып. 4. – С. 53–57.
11. Ценева Г.Я., Солодовникова Н.Ю., Воскресенская Е.А. Молекулярные аспекты вирулентности иерсиний // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2002. – Т. 4, № 3. – С. 248–266.

12. Bearden S.W., Sexton J.P. et al. Attenuated enzootic (pestoides) isolates of *Yersinia pestis* express active aspartase // C. Microbiology. – 2009. – Vol. 155, Part 1. – P. 198–209.

13. Mikula K.M., Kolodziejczyk R., Goldman A. *Yersinia* infection tools – characterization of structure and function of adhesions // Front. Cell. Infect. Microbiol. – 08 January 2013 | doi: 10.3389/fcimb.2012.00169.

REFERENCES

1. Anisimov A.P. Factors of *Yersinia pestis*, providing circulation and preservation of plague pathogen in ecosystems of nature foci // Zhurn. molekul. genetika, mikrobiologija i virusologija. – 2002. – № 3. – S. 3–4.

2. Afanas'eva G.A., Chesnokova N.P., Dal'vadjan S.M., Kuttyrev V.V. Endotoxin *Yersinia pestis*: features of structure, reception and mechanisms of induction of cytopathogenic effects (review) // Problemy osobo opasnyh infekcij – Saratov – 2008. – № 4 (98) – S. 43–48.

3. Balahonov S.V. Genomic markers of plague, pseudotuberculosis, cholera and brucellosis pathogens : diss. ... dokt. med. nauk. – Saratov, 2000. – 263 s.

4. Balahonov S.V., Verzhuckij D.B., Korzun V.M. i dr. Modern conditions of nature foci of plague in Siberia // Zhurnal infekcionnoj patologii. – 2009. – T. 16, № 3. – S. 16–20.

5. Bahteeva I.V. Research of functional activity of rN 6 antigene *Yersinia pestis* with use of sets of isogenic mutants: avtoref. dis. ... kand. med. nauk. – M., 2008. – 28 s.

6. Brilis V.I. i dr. Method of study of adhesive process of mictorganisms // Lab. delo. – 1986. – № 4. – S. 210–212.

7. Varivoda T.Ju., Kagramanov V.S. Study of influence of antigens of plague microbe on the appearance of hypoxic condition in experimental animals // Sbornik materialov mezhdunarodnoj nauchnoj konferencii. Problemy biologicheskoy i jekologicheskoy bezopasnosti. 22–25 maja. – 2000. – Obolensk. – S. 23–24.

8. Domaradskij I.V. Plague: modern condition, hypothesis, problems. – Saratov: Izd-vo Saratovskogo medicinskogo in-ta, 1993. – 130 s.

9. Ivanova T.A. i dr. Guideline on the use of indices of adhesive activity of *Yersinia pestis* for evaluation of virulence. – Irkutsk, 2012. – 8 s.

10. Konovalova Zh.A. Muhturgin G.B., Dubrovina V.I., Ivanova T.A. i dr. Activity of glucose-6-phosphatedehydrogenase of plague microbe *Yersinia pestis* with different plasmide profile and interacting with it peritoneal macrophages of guinea pigs // Izvestija Irkutskogo gosudar. un-ta. – 2011. – Serija «Biologija. Jekologija». – T. 4, Vyp. 4. – S. 53–57.

11. Ceneva G.Ja., Solodovnikova N.Ju., Voskresenskaja E.A. Molecular aspects of virulence of *Yersinia pestis* // Klinicheskaja mikrobiologija i antimikrobnaja himioterapija. – 2002. – T. 4, № 3. – S. 248–266.

12. Bearden S.W., Sexton J.P. et al. Attenuated enzootic (pestoides) isolates of *Yersinia pestis* express active aspartase // C. Microbiology. – 2009. – Vol. 155, Part 1. – P. 198–209.

13. Mikula K.M., Kolodziejczyk R., Goldman A. *Yersinia* infection tools – characterization of structure and function of adhesions // Front. Cell. Infect. Microbiol. – 08 January 2013 | doi: 10.3389/fcimb.2012.00169.

Сведения об авторах

Дубровина Валентина Ивановна – доктор биологических наук, старший научный сотрудник, заведующий лабораторией патофизиологии ФКУЗ Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора (664047, г. Иркутск, ул. Трилисера, 78; факс: 8 (3952) 22-01-40; e-mail: dubrovina-valya@mail.ru)

Мухтургин Геннадий Борисович – младший научный сотрудник лаборатории экспериментальных животных ФКУЗ Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора

Балахонov Сергей Владимирович – доктор медицинских наук, директор ФКУЗ Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора

Витязева Светлана Александровна – кандидат медицинских наук, научный сотрудник отдела микробиологии чумы ФКУЗ Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора

Старовойтова Татьяна Пантелеевна – научный сотрудник лаборатории патофизиологии ФКУЗ Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора

Иванова Татьяна Александровна – заведующая лабораторией экспериментальных животных ФКУЗ Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора

Коновалова Жанна Анатольевна – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник научно-производственного отдела ФКУЗ Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора

Владимирова Алена Михайловна – младший научный сотрудник лаборатории патофизиологии ФКУЗ Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора

Information about the authors

Dubrovina Valentina Ivanovna – doctor of biological sciences, MD, chief scientific officer, head of laboratory of pathophysiology of Irkutsk Antiplague Research Institute of Siberia and Far East of Rospotrebnadzor (Irkutsk, Trilisera str., 78, 664047; tel. (3952) 22-01-35, fax: 8 (3952) 22-01-40; e-mail: dubrovina-valya@mail.ru)

Mukhturgin Gennadiy Borisovich – junior scientific officer of laboratory of experimental animals of Irkutsk Antiplague Research Institute of Siberia and Far East of Rospotrebnadzor

Balakhonov Sergey Vladimirovich – doctor of medical sciences, MD, professor, director of Irkutsk Antiplague Research Institute of Siberia and Far East of Rospotrebnadzor

Vityazeva Svetlana Aleksandrovna – candidate of medical sciences, scientific officer of the department of microbiology of plague of Irkutsk Antiplague Research Institute of Siberia and Far East of Rospotrebnadzor

Starovoytova Tatiana Panteleevna – scientific officer of pathophysiology of Irkutsk Antiplague Research Institute of Siberia and Far East of Rospotrebnadzor

Ivanova Tatiana Aleksandrovna – head of the laboratory of experimental animals of Irkutsk Antiplague Research Institute of Siberia and Far East of Rospotrebnadzor

Konovalova Zhanna Anatolevna – candidate of medical sciences, chief scientific officer of research-and-production department of Irkutsk Antiplague Research Institute of Siberia and Far East of Rospotrebnadzor

Vladimirova Alena Mikhaylovna – junior scientific officer of laboratory of pathophysiology of Irkutsk Antiplague Research Institute of Siberia and Far East of Rospotrebnadzor