

Т.П. Старовойтова, Т.А. Иванова, Г.Б. Мухтургин, С.А. Витязева, В.И. Дубровина,
К.М. Корытов, С.В. Балахонов

ИЗМЕНЕНИЯ КЛЕТОЧНОГО СОСТАВА ПЕРИТОНЕАЛЬНОЙ ЖИДКОСТИ БЕЛЫХ МЫШЕЙ ПРИ ИНФЕКЦИОННОМ ПРОЦЕССЕ, ВЫЗВАННОМ *YERSINIA PESTIS* С РАЗЛИЧНЫМ ПЛАЗМИДНЫМ СОСТАВОМ

Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока (Иркутск)

В статье представлены данные о влиянии плазмидного состава чумного микроба на субпопуляционный состав мононуклеарных клеток перитонеальной жидкости белых мышей на ранних сроках инфекционного процесса. Показано, что изменение клеточного состава перитонеальной жидкости экспериментальных животных зависит от плазмидного профиля штаммов чумного микроба. В ходе эксперимента также выявлена фазность в изменении количественного состава тучных клеток перитонеальной жидкости белых мышей, инфицированных штаммами *Yersinia pestis* с разным плазмидным спектром.

Ключевые слова: *Yersinia pestis*, перитонеальная жидкость, вирулентность

CHANGES IN CELLULAR COMPONENTS OF PERITONEAL FLUID OF WHITE MICE WITH INFECTION CAUSED BY *YERSINIA PESTIS* WITH DIFFERENT PLASMID PROFILE

T.P. Starovoytova, T.A. Ivanova, G.B. Mukhturgin, S.A. Vityazeva, V.I. Dubrovina,
K.M. Korytov, S.V. Balakhonov

Irkutsk Antiplague Research Institute of Siberia and Far East, Irkutsk

The article presents the data on the influence of *Yersinia pestis* plasmid profile on subpopulation structure of mononuclear cells of peritoneal fluid of mice at the early stages of infectious process. It was showed that change of cellular composition of peritoneal fluid of the experimental animals depended on the plasmid profile of *Yersinia pestis* strains. The phase character in the changes of quantitative composition of the mast cells of peritoneal fluid of white mice infected with *Y. pestis* strains with different plasmid spectrum was determined.

Key words: *Yersinia pestis*, peritoneal fluid, virulence

Подавляющее большинство факторов вирулентности *Yersinia pestis* связаны с плазмидным составом. Генном возбудителя чумы основного подвида – *Yersinia pestis* subspecies *pestis* – имеет три плазмиды – pYV(45МДа), pYP(6МДа) и pYT(61МДа), их роль хорошо изучена в реализации патогенных свойств иерсиний. С наличием плазмиды pYV штаммы иерсиний проявляют многие фенотипические признаки: клеточную адгезию, аутоагглютинацию, поверхностную агглютинацию, а также синтез белков наружной мембраны, в том числе V- и W-антигенов и других белков, действие которых направлено на подавление фагоцитарной активности клеток иммунной системы. Плазмиды pYP и pYT видоспецифичны. Плазмида pYP детерминирует синтез бактериоцина пестицина 1 и активатора плазминогена, а плазмида pYT кодирует два наиболее хорошо изученных фактора вирулентности – мышинный токсин и F1 капсулы [5, 8, 9]. Отличительным признаком возбудителя, циркулирующего в Тувинском очаге, является наличие в его геноме дополнительной четвертой плазмиды pTP33 с пока невыясненными функциями. Предполагают, что данная плазмида представляет собой генетически модифицированный вариант резидентной плазмиды 9,5 kD, несущей гены *pla* (активатор плазминогена) и *psl* (пестицин 1) [2]. Утрата плазмид приводит к изменению биохимических, культуральных свойств, а также к снижению или полной утрате вирулентности возбудителя [1, 5, 8].

Ведущим клиническим признаком чумной инфекции и интоксикации, определяющим тяжесть течения

и исход заболевания, является нарушение гомеостаза макроорганизма. Первичными мишенями для эндотоксина являются полиморфноядерные лейкоциты, макрофаги, моноциты, клетки эндотелия и другие клеточные элементы. Изменение клеточного состава перитонеальной жидкости можно расценивать как диагностический критерий тяжести болезни при многих заболеваниях, в том числе и при чуме. В связи с этим оценка количественного и качественного клеточного состава перитонеальной жидкости у белых мышей при инфекционном процессе, вызванном *Y. pestis* с различным плазмидным составом, представляет большой интерес.

Цель работы: исследовать динамику изменения субпопуляционного состава мононуклеарных клеток перитонеальной жидкости белых мышей на ранних сроках экспериментальной чумной инфекции.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Экспериментальной моделью в опытах служили 175 беспородных, но стандартных по условиям содержания и весу (18–20 г) белых мышей обоих полов. Животных выводили из эксперимента в соответствии с «Правилами лабораторной практики в Российской Федерации», утвержденными Приказом Минздрава РФ № 267 от 19.06.2003 г., и Национальным стандартом РФ ГОСТ Р 53434-2009 «Принципы надлежащей лабораторной практики».

В работе использовали 6 штаммов *Y. pestis* subsp. *pestis* и *Y. pestis* subsp. *altaica* из коллекции музея Ир-

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 ⁺	авирулентен
<i>Y. pestis</i> subsp. <i>pestis</i> И-3480	Иркутский противочумный институт	pYP ⁺ pYV ⁺ pTP33 ⁺ pYT ⁺	авирулентен
<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> subsp. <i>altaica</i> И-2948	Горно-алтайский природный очаг чумы	pYP ⁺ pYV ⁺ pYT ⁺	3 × 10 ⁸ / остаточная вирулентность
<i>Y. pestis</i> subsp. <i>altaica</i> И-2948/3	Иркутский противочумный институт	pYP ⁺ pYV ⁺ pYT ⁺	авирулентен

кутского научно-исследовательского противочумного института Роспотребнадзора (табл. 1).

Интактные белые мыши были разделены на 6 опытных и 1 контрольную группы по 25 особей в каждой. Животных опытных групп заражали *Y. pestis* в концентрации 1 × 10⁶ м. к. в объеме 0,5 мл интраперитонеальным способом. I опытной группе животных вводили выращенную при температуре 28 °С двухсуточную культуру *Y. pestis* subsp. *pestis* И-2638, II группе – *Y. pestis* subsp. *pestis* И-3479, III группе – *Y. pestis* subsp. *pestis* И-3480, IV опытную группу животных заражали референтным Горно-Алтайским штаммом *Y. pestis* subsp. *altaica* И-2359, V группу – *Y. pestis* subsp. *altaica* И-2948, VI группу – селекционным штаммом *Y. pestis* subsp. *altaica* И-2948/3.

Забор материала от экспериментальных животных (перитонеальная жидкость) производили через 30, 60, 90, 120 и 180 минут. Проводили подсчет общего числа ядерных клеток в 1 мл перитонеальной жидкости в фиксированных препаратах, окрашенных стандартными методами [6, 7]. Для бактериологического анализа кровь из сердца и перитонеальную жидкость (по 0,1 мл) засеивали на твердую питательную среду (агар Хоттингера, pH 7.2).

В работе использовали методы обзорной микроскопии. Количественную оценку общего числа лейкоцитов проводили с использованием унифицированного метода подсчета клеток в камере Горяева. Процентное соотношение различных видов лейкоцитов проводили методом морфологического исследования перитонеальной жидкости в мазках. При исследовании препаратов с использованием компьютерной программы «MoticImagesPlus» (версия 2) осуществляли дифференцированный подсчет тканевых базофилов (ТК), измеряли их диаметр и площадь. Степень активизации ТК оценивали по индексу дегрануляции клеток (ИДТК) – процентное соотношение дегранулированных тучных базофилов к их общему числу [3, 4].

Автоматический анализ изображения производили с помощью светового микроскопа «Zeiss» (Германия) с видеокамерой «Moticam 2000», разрешение 1392 × 1040 пикселей, ок. 10, об. 100.

Значимость результатов исследования получали математическими методами статистической обработки с применением сравнительного анализа по t-критерию Стьюдента и с применением компьютерной программы Statistica, версия 6.0 (StatSoft Inc. 19842001, ИПЧИ 31415926535897) и пакета программ

Microsoft Office Excel (2003). Результаты считали значимыми по отношению к контролю при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Общее количество клеток в перитонеальной жидкости у интактных животных составляет $4,3 \pm 0,9 \times 10^3$ в 1 см³, при этом макрофаги являются преобладающим клеточным типом и составляют $60,5 \pm 5,6$ % от общего числа клеток, а на долю лимфоцитов приходится $17,0 \pm 2,8$ %; $5,5 \pm 0,8$ % составляют клетки мезотелия и другие клеточные элементы.

У инфицированных белых мышей наблюдается фазность в изменении общего количества ядерных клеток. У животных, зараженных вирулентным штаммом *Y. pestis* subsp. *pestis* И-2638, через 30 мин общее число ядерных клеток резко возрастает до $1,5 \pm 0,4 \times 10^4$ в 1 см³, что превышает показатели у интактных животных в 3,4 раза. К 60 мин исследования показатели снижаются до интактных значений, продолжая уменьшаться в последующие сроки. Цитологическая картина перитонеальной жидкости имеет четкую взаимосвязь с заражающей культурой. У животных I группы через 30 мин после инфицирования отмечено увеличение количества лимфоцитов, превосходящее значение у интактных животных в 4 раза за счет резкого снижения числа моноцитов. Данные изменения выявлены во все сроки наблюдения. В перитонеальной жидкости белых мышей, инфицированных *Y. pestis* subsp. *pestis* И-2638, через 120 мин от начала эксперимента зарегистрировано увеличение количества сегментоядерных нейтрофилов в 2,5 раза, по сравнению с контролем ($p < 0,05$), и незначительное увеличение количества палочкоядерных нейтрофилов. На последнем сроке исследования в мазках перитонеальной жидкости выявляется большое количество фибробластов, агрегация лимфоцитов и большое количество делящихся клеток.

У белых мышей, зараженных *Y. pestis* subsp. *altaica* И-2359, *Y. pestis* subsp. *pestis* И-3479 и *Y. pestis* subsp. *altaica* И-2948/3, через 30 мин после начала эксперимента статистически значимые изменения отсутствуют. К 180 мин количество ядерных клеток в перитонеальном экссудате превосходит показатели в контроле в 2,8 ($p < 0,01$), 1,9 ($p < 0,05$) и 1,5 раза соответственно. При введении животным *Y. pestis* subsp. *pestis* И-3480 и *Y. pestis* subsp. *altaica* И-2948 через 30 мин отмечается повышение общего числа ядерных клеток с последующим снижением (120 мин) до уровня контроля, и к 180 мин показатель вновь увеличивается.

При просмотре мазков перитонеальной жидкости у животных всех опытных групп регистрируется клеточная пролиферация лимфоцитов, гистиоцитов, увеличение эозинофилов, тканевых базофилов, плазмочитов, клеток мезотелия и фибробластов.

Оценка морфологических свойств базофилов, их количество и функциональная активность представляют интерес при исследовании клеточного состава перитонеальной жидкости инфицированных животных.

Установлено, что у опытных белых мышей отмечается фазность в изменении количественного состава тканевых базофилов перитонеальной жидкости. Увеличение их числа у животных, зараженных *Y. pestis* subsp. *pestis* И-2638, регистрируется в 60 мин после введения культуры, превышая значения у интактных животных в 2,6 раза ($p < 0,05$). Затем данные показатели снижаются (90–120 мин) до значений интактных животных, к 180 мин вновь возрастают, достигая значений 8,5 против 2,5 в контроле ($p < 0,05$). Часть ТК представлены интестинальными – незрелыми формами (рис. 1), появление которых можно расценивать как процесс компенсации.

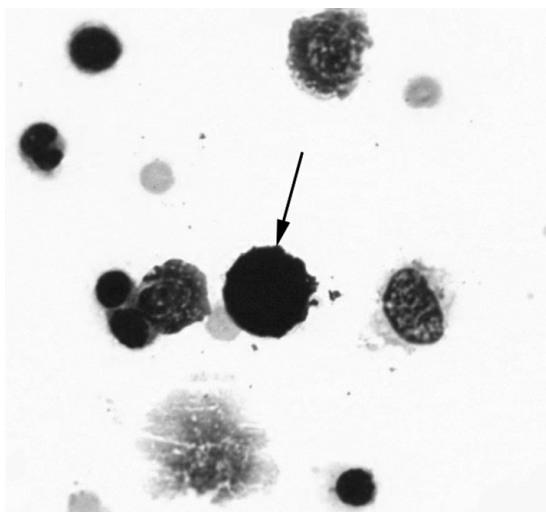


Рис. 1. Белая мышь, зараженная *Y. pestis* subsp. *pestis* И-2638. Перитонеальная жидкость. Интестинальные тучные клетки. Окраска по Романовскому – Гимзе, ув. $\times 100$.

В первые сроки исследования атипичные ТК составляют $21,0 \pm 1,8$ % от общего числа ТК, к последним срокам данные показатели возрастают до $25,2 \pm 2,1$ %. Атипичные ТК обладают минимальным функциональным потенциалом и имеют значительно меньшие размеры. Диаметр клеток составляет 6,8–8,6 мкм, что в среднем в 2,3 раза меньше ($p < 0,05$), по сравнению с диаметром типичных ТК. Таких клеток значительно меньше в перитонеальной жидкости белых мышей, зараженных *Y. pestis* subsp. *altaica* И-2359, и только в период 120–180 мин после заражения отмечаются единичные интестинальные тканевые базофилы. У животных других опытных групп атипичные ТК не выявляются.

В целом активизация системы ТК отражает общую адаптивную перестройку организма в ответ на введение антигена. Дегрануляция тканевых базофилов проходит по пути цельногранулярного экзоцитоза (рис. 2). Функциональная активность тканевых базофилов перитонеальной жидкости опытных животных имеет фазный характер. Самый высокий ИДТК отмечается

у белых мышей через 60 мин после заражения *Y. pestis* subsp. *pestis* И-2638 – $3,9 \pm 0,6$, что в 18,5 раза ($p < 0,01$) выше значения у интактных животных, затем показатель резко снижается, но к 180 мин исследований он вновь повышается, превышая значение в контрольной группе в 4,4 раза ($p < 0,01$). У селекционных клонов *Y. pestis* subsp. *pestis* И-3479 и И-3480 максимальное значение индекса дегрануляции имеет место через 90 мин от начала опыта и составляет $2,0 \pm 0,3$ и $1,3 \pm 0,4$ соответственно, при этом у белых мышей II опытной группы показатели во все сроки исследования были выше, чем у животных III опытной группы.

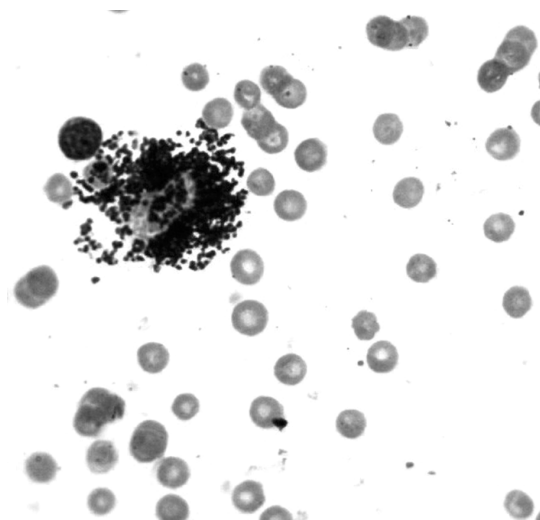


Рис. 2. Белая мышь, зараженная *Y. pestis* subsp. *pestis* И-2638. Перитонеальная жидкость. Тучные клетки. Дегрануляция. Окраска по Романовскому – Гимзе, ув. $\times 100$.

Наиболее выраженный фазный характер изменения тканевых базофилов отмечается у белых мышей IV опытной группы. Максимальное значение ИДТК приходится на второй и четвертый этапы исследования, превышая значения интактных животных в 5,8 и 7,4 раза ($p < 0,05$) соответственно. У особей, зараженных *Y. pestis* subsp. *altaica* И-2948/3, только на двух сроках исследования (60–90 мин) регистрируется увеличение дегрануляции тучных клеток в 3,6 и 2,6 раза соответственно ($p < 0,05$), в другие сроки данные статистически не значимы. У белых мышей V опытной группы максимальное значение ИДТК приходится на второй и последний срок исследования – 0,99 и 0,92 у. е., при в контроле отмечается 0,21 у. е.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, развитие инфекционного процесса в первые часы после инокуляции возбудителя чумы зависит от его плазмидного профиля, поскольку наиболее выраженные изменения количественного и качественного клеточного состава перитонеальной жидкости выявлены у экспериментальных животных при заражении штаммами с наличием $rYP^+rYV^+rYT^+$.

Выявленная в ходе эксперимента фазность в изменении количественного состава тучных клеток перитонеальной жидкости, особенно у особей, зараженных вирулентным штаммом *Y. pestis* subsp. *pestis* И-2638 ($rYP^+rYV^+rTP33^+rYT^+$), а также наличие незрелых и атипичных форм ТК свидетельствует о развитии процессов компенсации.

В целом активизация системы тучных клеток отражает общую адаптивную перестройку организма в ответ на введение антигена.

ЛИТЕРАТУРА REFERENCES

1. Анисимов А.Н. Факторы *Y. pestis*, обеспечивающие циркуляцию и сохранение возбудителя чумы в экосистемах природных очагов. Сообщение 1 // Молекулярная генетика, микробиол. и вирусол. – 2002. – № 3. – С. 3–23.
Anisimov A.N. Factors of *Y. pestis* providing circulation and preserving of plague infectious agent in the ecosystems of natural foci. Report I // Molekuljarnaja genetika, mikrobiol. i virusol. – 2002. – N 3. – P. 3–23. (in Russian)
2. Балахонов С.В. Обнаружение нуклеотидных последовательностей генов *pla*, *pstI* и *cafI* на криптической плазмиде 33 kD штаммов *Yersinia pestis* из тувинского очага чумы // 8th Int. Symp. on *Yersinia*. – Турку, Финляндия, 2002. – № 10. – С. 352–355.
Balakhonov S.V. Detection of *pla*, *pstI* and *cafI* gene nucleotide sequences in cryptic plasmid 33 kb *Yersinia pestis* strains from Tuva plague focus // 8th Int. Symp. on *Yersinia*. – Turku, Finland, 2002. – N 10. – P. 352–355. (in Russian)
3. Витязева С.А., Старовойтова Т.П., Бушкова А.В. Тканевые базофилы как представители многочисленной клеточной популяции АПУД-системы. – Деп. в ВИНТИ № 376-В2010 17.06.2010. – 18 с.
Vityazeva S.A., Starovoytova T.P., Bushkova A.V. Tissue basophiles as the representatives of numerous cell population of APUD-system. – Dep. in VINITI N 376-B2010 17.06.2010. – 18 p. (in Russian)
4. Красноженов Е.П., Федоров Ю.В. Влияние инфекционного процесса на морфофункциональную характеристику тканевых базофилов // Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунол. – 1996. – № 1. – С. 107–108.
Krasnozhenov E.P., Fedorov Yu.V. Influence of infectious process on morphofunctional characteristics

of tissue basophiles // Zhurn. mikrobiol., jepidemiol. i immunol. – 1996. – N 1. – P. 107–108. (in Russian)

5. Лебедева С.А., Трухачев А.Л., Иванова В.С., Арутунов Ю.И. и др. Вариабельность возбудителя чумы и проблемы его диагностики / Под ред. С.А. Лебедевой. – Ростов-на-Дону: Антей, 2009. – 533 с.

Lebedeva S.A., Trukhachev A.L., Ivanova V.S., Arutyunov Yu.I. et al. Diversity of plague infectious agent and problems of its diagnostics / Ed. by S.A. Lebedeva. – Rostov-on-Don: Antei, 2009. – 533 p. (in Russian)

6. Меньшиков В.В. и др. Лабораторные методы исследования в клинике. – М.: Медицина, 1987. – 365 с.

Menshikov V.V. et al. Laboratory methods of research in clinic. – Moscow: Medicina, 1987. – 365 p. (in Russian)

7. Методические указания МУ 3.4.2552-09 «Организация и проведение первичных противоэпидемических мероприятий в случаях выявления больного (трупа), подозрительного на заболевания инфекционными болезнями, вызывающими чрезвычайные ситуации в области санитарно-эпидемиологического благополучия населения» – Приложение 10.

Practical policies “Organization and conducting primary epidemiology on the chance of case (corpse) detection suspicious for infectious diseases causing emergency situations regarding sanitary and epidemiological welfare of the population”. – Suppl. 10. (in Russian)

8. 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.

Tseneva G.Ya. Solodovnikova N.Yu., Voskresenskaya E.A. Molecular aspects of *Yersinia* virulence // Klinicheskaja mikrobiologija i antimikrobnaja himioterapija. – 2002. – Vol. 4, N 3. – P. 248–266. (in Russian)

9. Huang X.-Z., Nikolich M., Lindler L. Current trend in plague research: from genomics to violence // Clin. Med. Research. – 2006. – Vol. 4, N 3. – P. 189–199.

Сведения об авторах

Старовойтова Татьяна Пантелеевна – научный сотрудник лаборатории патофизиологии Иркутского научно-исследовательского противочумного института Сибири и Дальнего Востока (664047, г. Иркутск, ул. Триллсера, 78; тел.: 8 (3952) 22-01-35; e-mail: adm@chumin.irkutsk.ru)

Иванова Татьяна Александровна – заведующая лабораторией экспериментальных животных Иркутского научно-исследовательского противочумного института Сибири и Дальнего Востока

Мухтургин Геннадий Борисович – младший научный сотрудник лаборатории экспериментальных животных Иркутского научно-исследовательского противочумного института Сибири и Дальнего Востока

Витязева Светлана Александровна – кандидат медицинских наук, научный сотрудник отдела микробиологии чумы Иркутского научно-исследовательского противочумного института Сибири и Дальнего Востока

Дубровина Валентина Ивановна – доктор биологических наук, заведующая лабораторией патофизиологии Иркутского научно-исследовательского противочумного института Сибири и Дальнего Востока

Балахонов Сергей Владимирович – доктор медицинских наук, профессор, директор Иркутского научно-исследовательского противочумного института Сибири и Дальнего Востока

Корытов Константин Михайлович – младший научный сотрудник лаборатории патофизиологии Иркутского научно-исследовательского противочумного института Сибири и Дальнего Востока

Information about the authors

Starovoytova Tatiana Panteleevna – Research Officer of the Laboratory of Pathophysiology of Irkutsk Antiplague Research Institute of Siberia and Far East (Trilissera str., 78, Irkutsk, 664047; tel.: +7 (3952) 22-01-35; e-mail: adm@chumin.irkutsk.ru)

Ivanova Tatyana Aleksandrovna – Head of the Laboratory of Experimental Animals of Irkutsk Antiplague Research Institute of Siberia and Far East

Mukhturgin Gennadiy Borisovich – Junior Research Officer of the Laboratory of Experimental Animals of Irkutsk Antiplague Research Institute of Siberia and Far East

Vityazeva Svetlana Aleksandrovna – Candidate of Medical Sciences, Research Officer of the Laboratory of Plague Microbiology of Irkutsk Antiplague Research Institute of Siberia and Far East

Dubrovina Valentina Ivanovna – Doctor of Medical Sciences, Head of the Laboratory of Pathophysiology of Irkutsk Antiplague Research Institute of Siberia and Far East

Balakhonov Sergey Vladimirovich – Doctor of Medical Sciences, Professor, Director of Irkutsk Antiplague Research Institute of Siberia and Far East

Korytov Konstantin Mikhaylovich – Junior Research Officer of the Laboratory of pathophysiology of Irkutsk Antiplague Research Institute of Siberia and Far East