

**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 Rosпотребнадзор, 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, фосфогексоизомеразы, альдолазы, глицеральдегид-3-фосфат-дегидрогеназы) у чумного микроба значительно выше активности глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (Г6ФДГ), 6-фосфоглюконат-дегидрогеназы и транскетолазы. Из перечисленных энзимов апопомического 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 (pYR+pYV+pYT⁺). Наименьшие значения индекса поглощения ($M = 4,7; s = 0,5$) выявлены у фагоцитов, примированных *Y. pestis* subsp. *pestis* И-2638 (pYR+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 плазида pTP33 является продуктом рекомбинационного контегративного взаимодействия плазмид pYR 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 (pYR, pYV), обладают низкой адгезивной активностью и способствуют повышению поглотительной способности фагоцитов лабораторных животных. Можно предположить, что важную роль в этих процессах играет плазида кальцийзависимости, которая может обуславливать способность бактерий вирулентных штаммов ингибировать активность клеток иммунофагоцитарной системы. Вероятно, плазида 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 pYR и pYV, обладают низкими показателями адгезивной активности, имеют высокие показатели активности Г6ФДГ по сравнению с *Y. pestis* subsp. *pestis* И-2638 (pYR+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 государ. ун-та. – 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., Kutjrev 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. Трилиссера, 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 Rosпотребнадzor (Irkutsk, Trilissera 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 Rosпотребнадzor

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

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 Rosпотребнадzor

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

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

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

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