

С.А.Бугоркова, Д.Г.Филимонова

## ОЦЕНКА ТЯЖЕСТИ ТЕЧЕНИЯ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ТУЛЯРЕМИЙНОЙ ИНФЕКЦИИ ПО РЯДУ МОРФОМЕТРИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК

ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов, Российская Федерация

Целью исследования была разработка унифицированного подхода к оценке тяжести течения экспериментальной туляремии на основе применения морфометрического анализа. Экспериментальную туляремию воспроизводили на морских свинках обоего пола при их подкожном заражении вирулентными культурами туляреминого микроба. По результатам морфометрического анализа был отобран ряд параметров, наиболее полно характеризующих интенсивность дистрофических, некробиотических и некротических процессов, инфильтративных изменений в клетках и тканях зараженных животных, которые адекватно отражали функциональное состояние их систем жизнеобеспечения. Таким образом, применение количественного учета для характеристики изменений у экспериментальных животных при моделировании специфического инфекционного процесса позволяет унифицировать и объективизировать оценку тяжести течения последнего и способствует повышению качества экспериментальных исследований.

*Ключевые слова:* экспериментальная туляремиальная инфекция, морфометрический анализ.

S.A.Bugorkova, D.G.Filimonova

### Estimation of the Severity of Experimental Tularemia against a Number of Morphometric Characteristics

Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov, Russian Federation

Research objective consisted in the development of a unified approach to the evaluation of severity of experimental tularemia disease based on the morphometric analysis. Experimental tularemia infection was morbidized in Guinea pigs, both female and male, using subcutaneous inoculation with virulent tularemia microbe cultures. Subsequent to the results of morphometric analysis, selected was a range of indicators characterizing intensiveness of dystrophy, necrobiotic and necrotic processes, infiltrate changes within cells and tissues of the infected animals to fullest extent, and reflecting a life-support system functioning state adequately. Thus, application of quantitative counting to distinguish the changes in experimental animals, while modeling specific infectious process, allowed for standardization and verification of severity evaluation approach and facilitated increase in quality of experimental investigations.

*Key words:* experimental tularemia disease, morphometric analysis.

Эпидемиологическая ситуация по туляремии на территории России продолжает оставаться нестабильной. С определенной периодичностью проявления этой инфекции отмечаются на территории большинства субъектов Российской Федерации [1]. Только в Новосибирской области за девять месяцев 2010 г. зарегистрировано 19 случаев туляремии у людей [6].

Возбудитель туляремии – *Francisella tularensis* – имеет длительную историю. При этом представления о факторах патогенности и иммуногенности этого микроорганизма, а также о механизмах их реализации в условиях макроорганизма весьма ограничены [12]. Возбудитель туляремии является факультативным внутриклеточным паразитом, причина высокой патогенности которого остается до конца не раскрытой. Следовательно, не решенным остается ряд вопросов, касающихся оценки степени повреждающего действия микроорганизма на тканевые и клеточные структурные элементы макроорганизма, чем и обусловлена актуальность исследований патогенеза данного заболевания с использованием новых возможностей аппаратно-программного обеспечения.

Опираясь на современные данные о механизмах

развития туляремиальной инфекции [14], интерес представляет более подробная морфометрическая характеристика изменений, возникающих в макроорганизме. В настоящее время усложняется методическая база научных исследований и, наряду с классическими методами, все чаще в экспериментальной морфологии применяют компьютерные технологии. Морфометрический анализ при оценке состояния функционально значимых органов и систем биомодели, используемой в моделировании специфического инфекционного процесса, позволяет решать вопросы, связанные с разработкой унифицированного подхода к учету тяжести течения патологического процесса или характеристике адаптационно-компенсаторных состояний у экспериментальных животных.

Целью исследования была разработка унифицированного подхода к оценке тяжести течения экспериментальной туляремиальной инфекции на основе применения морфометрического анализа.

### Материалы и методы

Эксперимент проводился на здоровом поголо-

вье морских свинок агути (пестрые), полученных из филиала «Андреевка» питомника НЦБМТ РАМН. В эксперимент брали животных обоего пола (35 особей) возраста 4–5 мес. массой ( $350 \pm 50$ ) г. До начала эксперимента животных выдерживали в карантине в течение 7 сут в условиях вивария, затем морских свинок переводили в отделение с барьерной системой содержания, соответствующей BSL (biosafety level) III класса. Рацион питания животных был стандартным, сбалансированным. Дальнейшие исследования выполняли в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных». Экспериментальную туляремийную инфекцию воспроизводили путем подкожного заражения морских свинок культурой туляремийного микроба вирулентного штамма *F. tularensis* 503 в дозе 5 м.к./мл (1 Dcl). Для заражения использовали двухсуточную агаровую культуру 2-й генерации, выращенную на среде Мак-Коя. Контрольным животным в условиях, аналогичных опытным, подкожно вводили 0,5 мл 0,9 % раствора натрия хлорида. С момента заражения за животными было установлено наблюдение в течение 11 сут. К 5–7-м суткам у зараженных животных отмечали уменьшение аппетита, снижение активности и веса. На 10–11-е сутки после заражения животных опытной и контрольной групп выводили из эксперимента хлороформом, и сразу проводили морфологическое исследование. Морских свинок вскрывали и регистрировали патолого-анатомические изменения в органах, биометрию забираемого материала. Для бактериологического исследования делали посевы из органов (селезенка, кровь из сердца) на питательную среду для культивирования и выделения туляремийного микроба (FT агар). Для гистологического исследования у животных брали кусочки внутренних органов: участок кожи в месте введения культуры, селезенки, печени, почек с надпочечниками, регионарных и отдаленных лимфатических узлов, легких, сердца. Гистологический материал фиксировали в 10 % водном нейтральном растворе формалина. Обезживание, пропитку и заливку в парафин гистологического материала выполняли по стандартной методике. Готовые полутонкие парафиновые срезы окрашивали растворами гематоксилина и эозина [9]. Морфометрический анализ выполняли с помощью денситоморфометрической программы (ДММ – версия 2.1.0.0.) аппаратно-программного комплекса МЕКОС-Ц. Статистическую обработку полученных данных осуществляли, следуя соответствующим рекомендациям [2]. Морфометрические характеристики, полученные с помощью программы ДММ, статистически обрабатывали в рамках возможностей, предусмотренных программой.

### Результаты и обсуждение

Туляремия – острое природно-очаговое инфекционное заболевание, характеризующееся септице-

мией, лихорадкой, обязательным и типичным поражением лимфатических узлов. Вирулентность возбудителя туляремии полидетерминантна и определяется целым комплексом факторов, обеспечивающих микроорганизмам способность преодолевать защитные барьеры макроорганизма, быстро размножаться в нем и вызывать инфекционный процесс.

У морских свинок, зараженных культурой вирулентного штамма туляремийного микроба, в месте введения культуры регистрировали крупные очаги расплавления подкожной клетчатки, участки гнойного поражения тканей. При гистологическом исследовании места введения культуры отмечали очаги обильной инфильтрации подкожной и межмышечной клетчатки полиморфно-ядерными лейкоцитами (ПЯЛ) с участками некроза мышечных волокон (рис. 1, А, Б). Регионарные лимфатические узлы (РЛУ) были увеличены в размере до 0,5–0,7 мм в диаметре, плотные. Микроскопия РЛУ выявляла разлитое гнойное воспаление с очагами некроза (рис. 1, В). Аналогичные, но очаговые изменения были характерны для отдаленных групп лимфатических узлов (ОЛУ). Селезенка у подопытных животных была увеличена (длина  $2,75 \pm 0,64$  см, ширина  $1,5 \pm 0,82$  см, толщина  $0,6 \pm 0,17$  см), уплотнена, темно-малинового цвета с множеством беловато-сероватых узелков ( $37,5 \pm 2,45$  штук на орган) размером порядка 0,05–0,1 мм. При гистологическом исследовании органа обнаруживали картину гнойно-некротического спленита (рис. 1, Г). По результатам бактериологического исследования в посевах из селезенки и крови были выделены *F. tularensis* исходного штамма.

При генерализации туляремийной инфекции часть микробов погибает с высвобождением эндотоксина, что проявляется комплексом повреждений печени, почек и легких, характерных для бактериального эндотоксикоза [8].

Печень у зараженных животных была увеличена в размере, плотная, полнокровная, с единичными белесоватыми узелками ( $4,2 \pm 1,45$  штук на орган), размером от 0,1 до 0,2 мм. При гистологическом исследовании в органе на фоне относительного застоя в системе циркуляции крови отмечали крупные поля лимфогистиоцитарной инфильтрации со значительным включением ПЯЛ, располагающиеся в зонах триад или вокруг сосудов – до ( $266459,91 \pm 97752,41$ ) мкм<sup>2</sup> (рис. 1, Д). Встречались единичные преимущественно эпителиоидно-клеточные (рис. 1, Е) гранулемы (до  $3,1 \pm 0,89$  в срезе) размером до ( $23830,30 \pm 1964,12$ ) мкм<sup>2</sup>. Дистрофическое поражение гепатоцитов было различной степени выраженности, при этом характерным образом менялось ядерно-цитоплазматическое отношение (ЯЦО) в опытной и контрольной группах и составляло 0,16 и 0,22 соответственно. Деструктивный индекс (ДИ), характеризующий удельный вес в клеточной популяции элементов с проявлениями цитопатологии, был равен 0,78, что более чем в 6 раз превы-

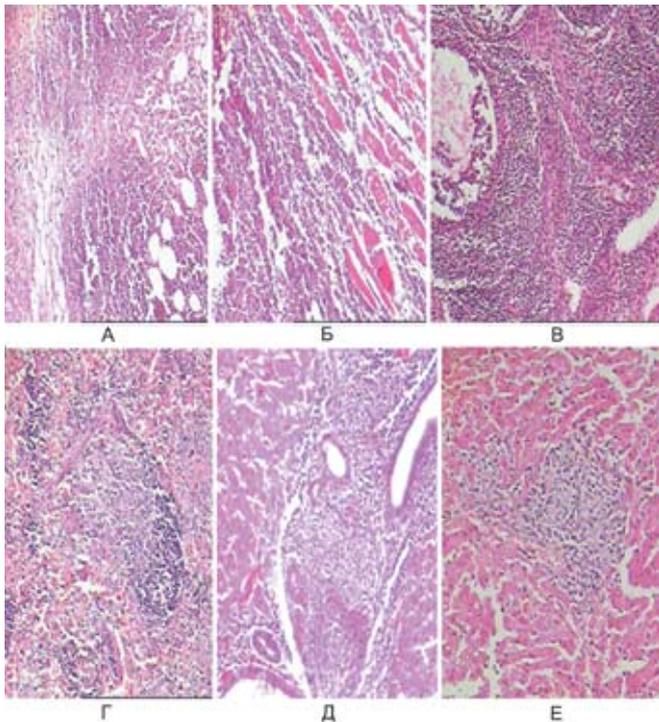


Рис. 1. Морская свинка. Подкожное заражение *F. tularensis* 503, 11-е сутки наблюдения:

*A, B* – кожа места введения культуры, гнойное воспаление, очаговый некроз; *B* – регионарный лимфатический узел, гнойно-некротический лимфаденит; *Г* – селезенка, гнойно-некротический спленит; *Д* – печень, поля лимфогистиоцитарной инфильтрации; *Е* – печень, эпителиоидноклеточная гранулема. Окраска гематоксилин-эозином. Ув.  $\times 100$

сило аналогичный показатель в контрольной группе (0,12). В отдельных участках регистрировали зоны некробиоза и некротического поражения клеток, достаточно густо инфильтрированные лейкоцитами. Для определения учитываемых параметров проводилась полуавтоматическая и автоматическая сегментация характеризуемых структур с помощью аппаратно-программного комплекса МЕКОС-Ц (рис. 2). Морфометрическая характеристика очагов гнойно-некротического поражения паренхимы печени в силу размытости их границ вызывала затруднение при автоматической сегментации. Характерной была реакция со стороны звездчатых ретикуло-эндотелиоцитов (клеток Купфера) в виде резкого уменьшения их количества у зараженных животных до  $5,2 \pm 1,24$  (в контроле –  $14,8 \pm 2,48$ ). Такое резкое (в 2,8 раза) падение количества клеток Купфера указывало на определенный блок ретикуло-эндотелиальной системы у подопытных животных.

Выживаемость в клетках ретикуло-эндотелиальной фагоцитирующей системы макроорганизма – ключевая характеристика туляремийного микроба. Предполагается, что выброс фактора некроза опухоли (ФНО $\alpha$ ) из клеток Купфера и следующие за этим процессы вторичной активации лейкотриенового каскада в альвеолярных макрофагах, синтеза и секреции фактора агрегации тромбоцитов лежат в основе повреждения легких [3, 4]. Доказана ускоряющая роль ФНО $\alpha$  макроорганизма на скорость

размножения вирулентных штаммов микроорганизмов [10]. Выделяемые под действием бактериальных токсинов цитокины и биологически активные вещества макроорганизма, участвующие в межклеточных взаимодействиях, могут выступать специфическими факторами, используемыми бактериями для своего размножения [5, 10].

В легких у зараженных *F. tularensis* животных отмечали участки неравномерного полнокровия капилляров, умеренную очаговую инфильтрацию межальвеолярных перегородок лимфоцитами и макрофагами, единичные периваскулярные инфильтраты площадью до  $(61843,16 \pm 52974,50)$  мкм<sup>2</sup> и до  $2,95 \pm 0,89$  на срезе, состоящие из ПЯЛ, лимфоцитов и эпителиоидных клеток. Перфузионно-вентиляционное отношение (ПВО), определяемое по отношению площади альвеол (рис. 2, Г) к площади сосудов (рис. 2, Д) на единицу площади среза, у животных опытной группы составляло 2,14, что значительно ниже показателя ПВО в группе контрольных морских свинок – 27,9. При резком угнетении показателя ПВО на территории легких развиваются дисметаболические и медиаторные процессы, лежащие в основе формирования нарушений гемодинамики, вентиляции и мощного повреждения легочной ткани.

Липополисахарид (ЛПС) туляремийного микроба обладает многофакторностью воздействия на макроорганизм [7], что затрудняет выделение эффектов его прямого или опосредованного, обусловленного индукцией биологически активных соединений [11], влияния на клетки последнего. В этом случае применение морфометрического анализа позволяет наиболее полно охарактеризовать функциональное состояние систем жизнеобеспечения макроорганизма. Взаимодействие ЛПС туляремийного микроба с макрофагами запускает последовательный каскад реакций, приводящих к клеточным и организменным изменениям, патогенез развития которых до конца не изучен [13]. Регистрируемыми проявлениями этого взаимодействия будут нарушения гемодинамики, активация гемокоагуляции и агрегации тромбоцитов, интоксикация и как следствие – дисфункция паренхиматозных органов.

Почки у зараженных животных были увеличены в размере, дряблой консистенции, с резким полнокровием пирамид на фоне относительной анемии коркового вещества. При гистологическом исследовании регистрировали очаги выраженной дистрофии эпителия извитых канальцев вплоть до некробиоза отдельных клеток. Характерным было уменьшение количества почечных телец в поле зрения среза органа до  $9,85 \pm 2,48$  (в контроле  $16,5 \pm 4,38$ ). Изменение функционального состояния гломерулярного аппарата характеризовало увеличение площади почечных телец ( $6492,63 \pm 917,05$  мкм<sup>2</sup>) по сравнению с показателями у контрольных животных ( $4593,52 \pm 2214,81$ ) на фоне уменьшения площади самих сосудистых клубочков ( $2278,20 \pm 356,76$  в опытной группе,  $3328,42 \pm 1287,14$  в контрольной),

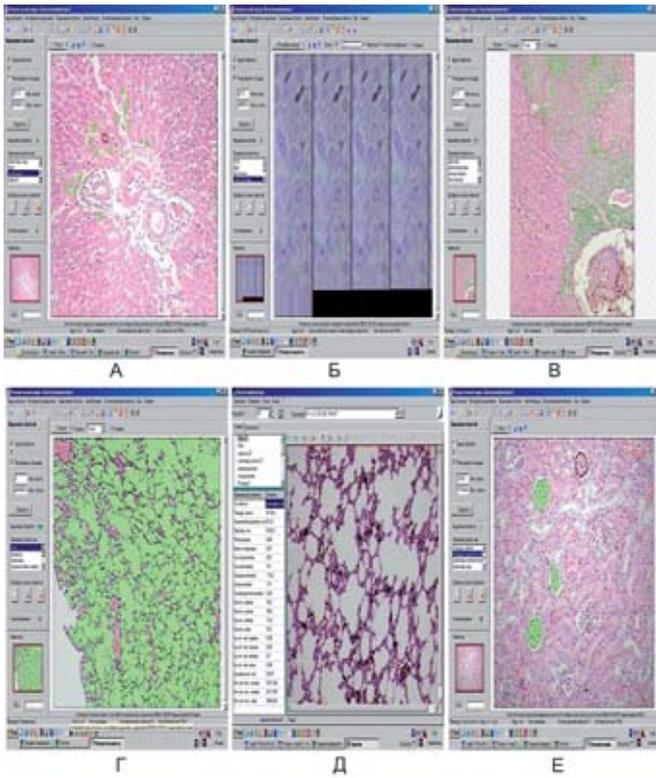


Рис. 2. Порядок сегментации объектов с помощью программы ДММ аппаратно-программного комплекса МЕКОС-Ц:

А – цитоплазмы и ядер светлых гепатоцитов; Б – звездчатых ретикулоэндотелиоцитов (клеток Купфера); В – очага клеточной инфильтрации в печени; Г – альвеол; Д – капилляров в легочной ткани; Е – почечных телец и сосудистых клубочков в почках морских свинок, инфицированных *F. tularensis* 503. Окраска гематоксилин-эозином. Ув. А –  $\times 100$ ; Б –  $\times 400$ ; В, Г, Д –  $\times 40$ ; Е –  $\times 100$

рис. 2, Е. Реакцией со стороны поврежденного гломерулярного аппарата является выделение ФНО $\alpha$ , интерлейкина 6 и фактора агрегации тромбоцитов [15], и этим обусловлены нарушения микроциркуляции в органе и другие гистопатологические эффекты.

Лежащий в основе всех этих изменений срыв адаптации у зараженных животных характеризовало резкое изменение стрессорного индекса (ИС), определяемого по изменению морфометрических параметров коркового и мозгового вещества надпочечников. Показатель ИС у животных опытной группы составлял 1,97 и был в 1,5 раза выше, чем аналогичный показатель в контрольной группе (1,25). Изменение морфометрических характеристик регистрировали на фоне резкого снижения феохромии мозгового вещества и опустошения адренкортикоцитов коркового вещества надпочечников.

Таким образом, на основании проведенных исследований был отобран ряд морфометрических параметров, которые наиболее полно характеризовали интенсивность дистрофических, некробиотических и некротических процессов, инфильтративных изменений в клетках и тканях зараженных животных. Учет отобранных количественных показателей позволяет адекватно судить о функциональном состоя-

нии систем жизнеобеспечения биомодели и может быть предложен для оценки степени тяжести течения экспериментальной туляремийной инфекции. Применение морфометрического анализа в экспериментальной морфологии, направленное на унификацию и объективизацию исследования, способствует повышению его качества.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Безсмертный В.Е., Попов В.П., Жуков В.И., Иванова С.М. Обзор эпизоотической ситуации по туляремии на территории Российской Федерации во втором полугодии 2008 г. и прогноз на первое полугодие 2009 г. Пробл. особо опасных инф. 2009; 2(100):11–3.
2. Бессмертный Б.С. Математическая статистика в клинической, профилактической и экспериментальной медицине. М.: Медицина; 1967. 303 с.
3. Ивашкин В.Т., Шульпекова Ю.О., Лукина Е.А. Классические провоспалительные цитокины и их биологические эффекты при заболеваниях печени. Мол. мед. 2003; 3:34–43.
4. Панин Л.Е., Максимов В.Ф., Коростышевская И.М. Влияние стимуляции клеток Купфера липополисахаридами на состояние ядерного аппарата гепатоцитов. Патол. физиол. 2001; 2:22–4.
5. Мишанькин Б.Н., Демьяненко С.В., Романова Л.В. Действие серотонина и дофамина на рост штаммов *Yersinia pestis* и *Francisella tularensis*. Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 2009; 2:93–6.
6. Окунев Л.П., Мазепа А.В. Эпизоотолого-эпидемиологическая ситуация в природных очагах туляремии Сибирского и Дальневосточного Федеральных округов в 2010 г. и прогноз на 2011 г. Пробл. особо опасных инф. 2011; 1(107):29–30.
7. Павлович Н.В., Тьяннова В.И. Возможные механизмы реализации токсического потенциала липополисахаридов патогенных бактерий. Мол. генет., микробиол. и вирусол. 2005; 2:9–13.
8. Писарев В.Б., Богомолова Н.В., Новочадов В.В. Бактериальный эндотоксикоз: взгляд патолога. Волгоград: Изд-во ВОЛГМУ; 2008. 307 с.
9. Саркисов Д.С., Перов Ю.Л. Микроскопическая техника: руководство. М.: Медицина; 1996. 542 с.
10. Томова А.С., Романова Ю.М., Гинцбург А.Л. Роль фактора некроза опухоли  $\alpha$  во взаимодействии макро- и микроорганизма. Вестник РАМН. 2005; 1:24–9.
11. Яковлев М.Ю. «Эндотоксиновая агрессия» как предболезнь или универсальный фактор патогенеза заболеваний человека и животных. Усп. совр. биол. 2003; 1:31–40.
12. Ellis J., Oyston C.F., Grenn M., Titball R.W. Tularemia. Clin. Microbiol. Rev. 2002; 15(4):631–46.
13. Fulop M., Manchee R., Titball R. Role of two outer membrane antigens in the induction of protective immunity against *Francisella tularensis* strains of different virulence. FEMS Immunol. Med. Microbiol. 1996; 13:245–7.
14. Tarnvik A., Berghund L. Tularemia. Eur. Resp. J. 2003; 21(2):361–73.
15. Zager R.A., Johnson A.C.M., Hanson S.Y., Lund S. Ischemic proximal tubular injury primes mice to endotoxin-induced TNF-(alpha) generation and systemic release. Am. J. Physiol. 2005; 28(2):89–97.

#### References

1. Bezsmertny V.E., Popov V.P., Zhukov V.I., Ivanova S.M. [Review of tularemia epizootic situation in the Russian Federation territory in the second half of 2008 and prognosis for the first half of 2009]. Probl. Osobo Opasn. Infek. 2009; (100):11–3.
2. Bessmertny B.S. [Mathematical statistics in clinical, preventive and experimental medicine]. M.: Meditsina; 1967. 303 p.
3. Ivashkin V.T., Shul'pekova Yu.O., Lukina E.A. [Classical pro-inflammatory cytokines, and their biological effects in hepatic diseases]. Mol. Med. 2003; 3:34–43.
4. Panin L.E., Maksimov V.F., Korostyshevskaya I.M. [Impact of Kupffer's cells stimulation with lipopolysaccharide on hepatocyte nucleic apparatus]. Patol. Fiziol. 2001; 2:22–4.
5. Mishan'kin B.N., Dem'yanenko S.V., Romanova L.V. [Serotonin and dopamine impact on *Yersinia pestis* and *Francisella tularensis* strain growth]. Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol. 2009; 2:93–6.
6. Okunev L.P., Mazepa A.V. [Epizootiological and epidemiological situation in the tularemia natural foci of Siberian and Far East Federal districts in 2010 and prognosis for 2011]. Probl. Osobo Opasn. Infek. 2011; (107):29–30.

7. Pavlovich N.V., Tynyanova V.I. [Possible mechanisms of implementation of lipopolysaccharide toxic potential in pathogenic bacteria]. Mol. Genet. Mikrobiol. Virusol. 2005; 2:9–13.
8. Pisarev V.B., Bogomolova N.V., Novochadov V.V. [Bacterial Endotoxigenicity: Pathologist's View-Point]. Volgograd: Volgograd State Medical University Publishing House; 2008. 307 p.
9. Sarkisov D.S., Perov Yu.L. [Microscopy Accessories: Practice Guidelines]. M.: Meditsina; 1996. 542 p.
10. Tomova A.S., Romanova Yu.M., Gintsburg A.L. [ $\alpha$ -Tumor necrosis factor. Its role in interaction between macro- and microorganism]. RAMS Bulletin. 2005; 1:24–9.
11. Yakovlev M.Yu. ["Endotoxin aggression" as pre-existing disease or generic pathogenesis factor of human and animal diseases]. Usp. Sovr. Biol. 2003; 1:31–40.
12. Ellis J., Oyston C.F., Grenn M., Titball R.W. Tularemia. Clin. Microbiol. Rev. 2002; 15(4):631–46.
13. Fulop M., Manchee R., Titball R. Role of two outer membrane antigens in the induction of protective immunity against *Francisella tularensis* strains of different virulence. FEMS Immunol. Med. Microbiol. 1996; 13:245–7.
14. Tarnvik A., Berglund L. Tularemia. Eur. Resp. J. 2003; 21(2):361–73.
15. Zager R.A., Johnson A.C.M., Hanson S.Y., Lund S. Ischemic proximal tubular injury primes mice to endotoxin-induced TNF-(alpha) generation and systemic release. Am. J. Physiol. 2005; 28(2):89–97.

**Authors:**

Bugorkova S.A., Filimonova D.G. Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe". 46, Universitetskaya St., Saratov, 410005, Russian Federation. E-mail: rusrapi@microbe.ru

**Об авторах:**

Бугоркова С.А., Филимонова Д.Г. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». Российская Федерация, 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: rusrapi@microbe.ru

Поступила 19.04.12.