

Е.В.Пименов<sup>1,2</sup>, В.А.Оборин<sup>3</sup>, А.Г.Ивонин<sup>1,2</sup>

### ВЛИЯНИЕ ЖИДКОЙ ЧАСТИ КРОВИ И ЕЕ ОТДЕЛЬНЫХ КОМПОНЕНТОВ НА ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ БАКТЕРИЙ *YERSINIA PESTIS* EV НИИЭГ С ЭРИТРОЦИТАМИ ЧЕЛОВЕКА *IN VITRO*

<sup>1</sup>Лаборатория сравнительной кардиологии Коми НЦ УрО РАН, Сыктывкар, Российская Федерация;<sup>2</sup>ФГБОУ ВПО «Вятская государственная сельскохозяйственная академия», Киров, Российская Федерация;<sup>3</sup>ФГБОУ ВПО «Вятский государственный гуманитарный университет», Киров, Российская Федерация

Целью настоящего исследования явилась оценка влияния жидкой составляющей крови и ее отдельных белковых фракций на адгезию бактерий *Y. pestis* EV НИИЭГ к эритроцитам человека *in vitro*. Регистрацию связывания бактерий с клетками-мишенями в экспериментах осуществляли с помощью фотометрического метода. В работе выявлено ингибирующее действие нативных плазмы и сыворотки крови, а также отдельных групп сывороточных белков (альбуминов и нормальных иммуноглобулинов) на прикрепление бактерий к эритроцитам. Результаты проведенных исследований позволили предположить о существовании двух возможных механизмов подавления адгезии клеток *Y. pestis* EV НИИЭГ к человеческим эритроцитам компонентами жидкой части крови: блокирования поверхностных микробных структур, ответственных за адгезивную функцию, и экранирования рецепторов эритроцитарной мембраны.

*Ключевые слова:* штамм *Y. pestis* EV НИИЭГ, адгезивная активность, эритроциты, плазма и сыворотка крови, альбумины, нормальные иммуноглобулины.

E.V.Pimenov<sup>1,2</sup>, V.A.Oborin<sup>3</sup>, A.G.Ivonin<sup>1,2</sup>

### Impact of the Liquid Part and Some Separate Components of Blood on the Process of Interaction between *Yersinia pestis* EV NIEG Bacteria and Human Red Blood Cells *in vitro*

<sup>1</sup>Laboratory of comparative cardiology of Komi Scientific Center of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Syktывkar; <sup>2</sup>Vyatka State Agricultural Academy, Kirov; <sup>3</sup>Vyatka State Humanities University, Kirov, Russian Federation

Objective of the research has been the evaluation of impact of blood liquid part and its separate protein fractions on the process of *Yersinia pestis* EV NIEG adhesion to human erythrocytes *in vitro*. Bacterial binding with target-cells has been registered using photometric technique. Identified has been inhibiting effect of blood native plasma and serum, as well as some groups of serum proteins, (albumins and normal immunoglobulins) on attachment of bacteria to human red blood cells. Based on the obtained results it has been assumed that there are two possible mechanisms of suppression of *Yersinia pestis* EV NIEG adhesion to human erythrocytes performed by the liquid components of blood – surface microbial structure blockage and erythrocyte membrane receptor shielding.

*Key words:* *Yersinia pestis* EV NIEG strain, adhesive activity, erythrocytes, blood plasma and serum, albumin, common immunoglobulins.

Чума является особо опасной бактериальной инфекционной болезнью с природной очаговостью и трансмиссивным механизмом передачи [6]. Факт присутствия возбудителя чумы (*Yersinia pestis*) в кровеносном русле у инфицированных людей и животных показан отечественными [2] и зарубежными [15] исследователями. Общеизвестно, что у диких грызунов бактериемия служит одним из факторов передачи чумного микроба блохами различным видам млекопитающих и тем самым способствует возникновению эпизоотий и эпидемий чумы [1].

Попав в кровь, чумные бактерии неизбежно контактирует с ее гуморальными факторами и форменными элементами. Однако если вопросы взаимодействия *Y. pestis* с лейкоцитами освещены [9], то роль эритроцитов периферической крови в развитии инфекционного процесса при чуме остается слабоизученной. При этом именно эритроциты, являясь самой многочисленной популяцией форменных элементов крови с огромной общей площадью поверхности (до 3800 м<sup>2</sup> у взрослого человека) [8], обладают наиболь-

шей потенциальной способностью к контактному взаимодействию с микроорганизмами, попавшими в кровеносное русло.

Сообщения, посвященные адгезии чумных бактерий к эритроцитам, в литературе крайне малочисленны. Показано, что свойство агглютинировать нативные эритроциты млекопитающих характерно для клеток *Y. pestis* [3] и выделенных из них белков – рН 6 антигена [12] и белка S-слоя [4]. По данным [13], чумные бактерии способны прикрепляться к поверхности эритроцитов в условиях *in vitro* и *in vivo*, а затем проникать внутрь клеток, вызывая их деструктивные изменения. В то же время нужно заметить, что с помощью метода световой микроскопии, использованного авторами указанной работы, практически невозможно установить, находится микробная клетка внутри эритроцита или адсорбирована на клеточной поверхности.

Ранее нами с применением оригинальной методики выявлена выраженная адгезивная активность клеток *Y. pestis* EV НИИЭГ в отношении эритроци-

тов человека, лабораторных и домашних животных в условиях *in vitro* [10], изучены механизмы адсорбции данного штамма на человеческих эритроцитах [11]. Учитывая, что в этих исследованиях применялись только отмытые эритроциты, представляло интерес изучение влияния жидкой внеклеточной части крови и ее отдельных белковых фракций на процесс цитадгезии бактерий *Y. pestis* EV НИИЭГ.

### Материалы и методы

В работе использовали клетки *Y. pestis* EV НИИЭГ, выделенные из коммерческой чумной живой сухой вакцины. Бактерии выращивали на ГРМ-агаре (рН 7,4) с добавлением генцианвиолета (1:100000) при температуре (28±1) °С в течение 48 ч, после чего суспендировали в 0,9 % растворе хлорида натрия (рН 7,4). Конечная концентрация клеток в суспензии соответствовала 1,0 у.е. оптической плотности (ОП) при длине волны проходящего света 540 нм и длине оптического пути кюветы 5 мм. При измерении ОП суспензии пользовались фотоэлектроколориметром КФК-2.

Периферическую венозную кровь 0 (I) группы получали в ФГЛУ «Кировская областная станция переливания крови» (Киров) от здоровых доноров. В качестве антикоагулянта применяли гепарин (5,0 ЕД/мл крови). Для выделения фракции эритроцитов пробы крови центрифугировали при 500 г в течение 10 мин, отбирали плазму и лейкоцитарную пленку (верхний слой осевших клеток), а эритроциты трижды отмывали 0,9 % раствором хлорида натрия (рН 7,4) при аналогичном режиме центрифугирования и ресуспендировали в этом же растворе. Конечная концентрация эритроцитов составляла 1,0·10<sup>12</sup>/л. Отобранную плазму крови использовали в отдельных сериях экспериментов (см. ниже), в остальных случаях утилизировали вместе с лейкоцитами.

Для получения сыворотки крови донорскую венозную кровь отбирали в стерильную пробирку без антикоагулянта, выдерживали при температуре (37±1) °С в течение 1 ч, отслаивали сгусток свернувшейся крови от стенок пробирки стерильной пастеровской пипеткой и помещали пробу в холодильник с температурой (4±2) °С на 24 ч. По истечении данного срока сыворотку отделяли от кровяного сгустка путем центрифугирования при 500 г в течение 10 мин. Кроме аутологичных плазмы и сыворотки крови в опытах использовали коммерческие препараты, содержащие отдельные фракции сывороточных белков – альбумин человеческий (НПО «Биомед», Пермь) и иммуноглобулин человеческий нормальный (ОАО «Микроген», Москва).

Уровень адгезии бактерий к эритроцитам определяли с помощью метода [10]. Для этого в пробирках смешивали по 2,5 мл суспензии бактерий и 1,0 мл суспензии отмытых эритроцитов. В качестве контроля использовали пробы, содержащие 2,5 мл суспензии бактерий и 1,0 мл 0,9 % раствора хлори-

да натрия (контроль № 1) и 2,5 мл 0,9 % раствора хлорида натрия и 1,0 мл суспензии отмытых эритроцитов (контроль № 2). Образцы инкубировали на вращающейся платформе при температуре (37±1) °С в течение 30 мин, центрифугировали при 500 г в течение 1,5 мин, после чего путем фотоколориметрии определяли значение ОП супернатанта в пробах. Показатель адгезии (ПА) рассчитывали по формуле:

$$ПА = \frac{D_{к1} + D_{к2} - D_{он}}{D_{к1}} \times 100 \%,$$

где ПА – показатель адгезии,  $D_{к1}$  – ОП супернатанта в контрольной пробе № 1,  $D_{к2}$  – ОП супернатанта в контрольной пробе № 2,  $D_{он}$  – ОП супернатанта в опытной пробе.

Для оценки влияния плазмы и сыворотки крови, а также отдельных фракций сывороточных белков на уровень адгезии пользовались вышеописанной схемой постановки эксперимента, однако в процессе приготовления опытных и контрольных проб № 2 в них вместо 1,0 мл суспензии отмытых эритроцитов вносили 0,75 мл тестируемого препарата (в цельном виде или в разведении) и 0,25 мл эритроцитарной массы, полученной после центрифугирования 1,0 мл суспензии эритроцитов (1000 г, 10 мин) и удаления супернатанта.

Статистическую обработку цифровых результатов и определение достоверности различий между двумя выборками проводили с помощью компьютерной программы для обработки медицинской информации «Biostat» версии 4.03.

### Результаты и обсуждение

Проведенные эксперименты показали, что все рассматриваемые препараты оказывали выраженное ингибирующее действие на адгезию бактерий *Y. pestis* EV НИИЭГ к эритроцитам (таблица). Наибольшей антиадгезивной активностью обладали аутологичные плазма и сыворотка крови человека, которые при использовании в цельном виде снижали величину ПА по сравнению с контролем (уровнем адгезии в отсутствии препаратов) в 7,3 и 5,2 раза соответственно. Ингибирующий адгезию эффект плазмы и сыворотки крови проявлялся вплоть до их разведения 1:64 и исчезал при разведении 1:128. Альбумин и нормальный иммуноглобулин человека, применяемые цельными, снижали ПА по сравнению с контролем в 2,2 и 1,9 раза соответственно. Антиадгезивное действие данных препаратов регистрировали до разведения 1:8.

О способности биологических жидкостей и их отдельных компонентов предотвращать адгезию патогенных бактерий к клеткам макроорганизма известно с 80-х годов XX в. [14]. По данным [5], антиадгезивная функция секретов и жидкостей организма связана с тем, что растворенные в них макромолекулы физиологически активных веществ взаимодействуют с поверхностными структурами бактериаль-

Уровень адгезии клеток *Y. pestis* EV НИИЭГ к эритроцитам человека в присутствии плазмы, сыворотки крови и отдельных сывороточных белков (M±m, n=7)

Препараты	ПА, %							
	Разведения препаратов в 0,9 % растворе хлорида натрия (рН 7,4)							
	б/р	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128
Нативная плазма крови	10,4±4,3***	18,1±6,3***	25,8±7,2***	37,1±6,1***	42,3±6,7**	53,8±4,1**	60,9±5,4*	75,8±3,9
Нативная сыворотка крови	14,7±5,8***	23,8±4,9***	28,1±4,6***	31,2±5,2***	47,5±5,2**	54,1±5,8*	62,7±2,0*	72,4±6,0
Альбумин человеческий	35,4±3,7***	52,7±5,2***	57,7±4,1*	63,0±2,8*	73,8±4,5	-	-	-
Иммуноглобулин человеческий нормальный	40,6±5,1***	47,3±6,3***	51,4±5,7**	60,2±4,9*	71,8±6,1	-	-	-
Контроль (без препаратов)	76,2±5,3							

Примечание: б/р – без разведения; «-» – исследование не проводилось. \*P<0,05, \*\*P<0,01, \*\*\*P<0,001 – различия достоверны по сравнению с контролем.

ных клеток и создают стерические препятствия для связывания с рецепторами на поверхности клеточных мишеней. Белковые или гликопротеиновые комплексы, связывающиеся с факторами адгезии микроорганизмов различных таксономических групп, выявлены практически в каждой биологической жидкости или секрете [7].

В результате проведенных исследований нами впервые установлено наличие у жидкой составляющей крови человека собственного защитного антимикробного действия, направленного на снижение адгезии чумного микроба к эритроцитам. Показано, что антиадгезивными свойствами в отношении штамма *Y. pestis* EV НИИЭГ обладают как нативная плазма и сыворотка крови человека, так и их отдельные белковые фракции – альбумины и нормальные иммуноглобулины. В то же время отсутствие статистически значимых различий между уровнями адгезии в присутствии цельных плазмы и сыворотки крови, а также их соответствующих разведений (от 1:2 до 1:64) косвенно указывало на неспособность плазменного белка фибриногена ингибировать связывание чумных бактерий с эритроцитами.

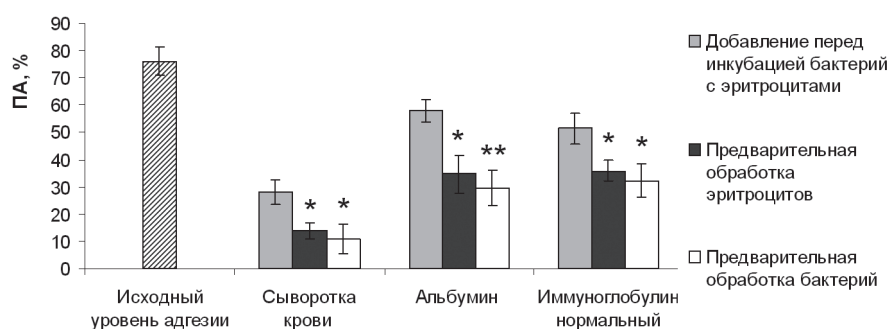
В последующем для выяснения возможных механизмов действия тестируемых препаратов на адгезию мы предварительно инкубировали сыворотку крови, альбумин и нормальный иммуноглобулин (разведения 1:4) с эритроцитами, либо с микроорганизмами на вращающейся платформе при температуре (37±1) °С в течение 30 мин, а уже затем в пробы добавляли интактные (необработанные) микробные клетки или эритроциты. После образцы инкубировали еще 30 мин при (37±1) °С и определяли интенсивность адгезивного процесса.

Обработка аутологичной сывороткой крови, альбумином и иммуноглобулином эритроцитов и бактерий до их последующего инкубирования с интактными бактериями или эритроцитами приводила к достоверному снижению ПА по сравнению с таковым при внесении препаратов в образцы непосредственно перед началом совместного инкубирования микробных клеток с эритроцитами (рисунок).

Полученные результаты позволяли предположить о наличии двух возможных механизмов прерывания прикрепления клеток *Y. pestis* EV НИИЭГ к эритроцитам человека изучаемыми препаратами: блокирования поверхностных структур микробных клеток, участвующих в адгезии, и экранирования рецепторов эритроцитарной мембраны. О существовании первого механизма свидетельствовало выявленное в эксперименте понижение уровня адгезии при предварительной обработке препаратами бактерий, о существовании второго – понижение аналогичного показателя при обработке эритроцитов.

Таким образом, с использованием метода фотокolorиметрии для регистрации цитадгезии бактерий *Y. pestis* EV НИИЭГ нами установлено, что нативная плазма и сыворотка крови человека, а также отдельные сывороточные белки (альбумины и нормальные иммуноглобулины) обладают выраженной способностью препятствовать прикреплению чумного микроба к красным кровяным клеткам в эксперименте *in vitro*. Для установления подобного эффекта в условиях *in vivo* необходимы дальнейшие исследования.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ (проект № 12-04-00426-а) и программы фундаментальных исследований УрО РАН (проект № 12-П-4-1069).



Показатель адгезии клеток *Y. pestis* EV НИИЭГ к эритроцитам человека при различных вариантах внесения сыворотки крови и отдельных сывороточных белков в систему «бактерии-эритроциты»:

\*P<0,05, \*\*P<0,01 – различия достоверны по сравнению с добавлением препарата в пробы непосредственно перед инкубацией бактерий с эритроцитами

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Анисимов А.П. Факторы *Yersinia pestis*, обеспечивающие циркуляцию и сохранение возбудителя чумы в экосистемах природных очагов. Сообщение 2. *Мол. генет., микробиол. и вирусол.* 2002; 4:3–11.
2. Бибикина В.А., Классовский Л.Н. Передача чумы блохами. М.: Медицина; 1974. 188 с.
3. Водопьянов С.О., Мишанькин Б.Н. Пили адгезии у *Yersinia pestis*. *Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол.* 1985; 6:13–7.
4. Дятлов И.А., Антонова О.А. Выявление и характеристика антигена *Yersinia pestis*, проявляющего свойства белков S-слоя. *Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол.* 1999; 4:90–1.
5. Еропкина Е.М., Афиногенов Г.Е. Антиадгезивная активность белковых комплексов биологических жидкостей и секретов. *Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол.* 1994; 11:110–6.
6. Кутырев В.В. Актуальные проблемы особо опасных инфекционных болезней и санитарная охрана территорий в современных условиях. *Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол.* 2008; 1:17–23.
7. Макаренкова И.Д., Компанец Г.Г., Запорожец Т.С. Ингибирование адгезии патогенных микроорганизмов на эукариотических клетках. *Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол.* 2006; 3:121–5.
8. Муравьев А.В., Чепоров С.В. Гемореология (экспериментальные и клинические аспекты реологии крови). Ярославль: Издательство ЯГПУ; 2009. 178 с.
9. Наумов А.В., Ледванов М.Ю., Дроздов И.Г. Иммунология чумы. Руководство. Саратов; 1992. 172 с.
10. Оборин В.А., Пименов Е.В., Ивонин А.Г. Изучение адгезии бактерий вакцинного штамма *Yersinia pestis* EV НИИЭГ к эритроцитам животных фотоколориметрическим методом. *Пробл. особо опасных инф.* 2010; 1(103):48–50.
11. Пименов Е.В., Оборин В.А., Ивонин А.Г. Исследование механизмов взаимодействия бактерий вакцинного штамма *Yersinia pestis* EV НИИЭГ с эритроцитами человека. *Пробл. особо опасных инф.* 2012; 4(114):54–7.
12. Степаншина В.Н., Гремякова Т.А., Анисимов А.П., Потапов В.Д. Физико-химическая и биологическая характеристика рН 6 антигена *Yersinia pestis*, выделенного иммуносорбционным методом. *Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол.* 1993; 3:12–7.
13. Feodorova V.A., Devdariani Z.L. The interaction of *Yersinia pestis* with erythrocytes. *J. Med. Microbiol.* 2002; 51(2):150–8.
14. Mertz P.M., Patti J.M., Marcin J.J., Marshall D.A. Model for studying bacterial adherence to skin wounds. *J. Clin. Microbiol.* 1987; 25(9):1601–4.
15. Perry R.D., Fetherston J.D. *Yersinia pestis* – etiologic agent of plague. *Clin. Microbiol. Rev.* 1997; 10:35–66.

References

1. Anisimov A.P. [*Yersinia pestis* factors responsible for plague agent circulation and persistence in ecological systems of natural foci. Communication 2]. *Mol. Gen. Microbiol. Immunol.* 2002; 4:3–11.

2. Bibikova V.A., Klassovsky L.N. [Plague Transmission by Fleas]. М.: Meditsina; 1974. 188 p.
3. Vodop'yanov S.O., Mishan'kin B.N. [Pilli of adhesion in *Yersinia pestis*]. *Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol.* 1985; 6:13–7.
4. Dyatlov I.A., Antonova O.A. [Identification and characterization of *Yersinia pestis* antigen exerting S-layer protein properties]. *Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol.* 1999; 4:90–1.
5. Eroпкина E.M., Afinogenov G.E. [Adhesive activity of protein complexes of biological liquids and secretions]. *Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol.* 1994; 11:110–6.
6. Kutyrev V.V. [Pressing issues of particularly dangerous infectious diseases and sanitary protection of the territories under current conditions]. *Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol.* 2008; 1:17–23.
7. Makarenkova I.D., Kompanets G.G., Zaporozhets T.C. [Inhibition of pathogenic microorganism adhesion onto eukaryotic cells]. *Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol.* 2006; 3:121–5.
8. Murav'ev A.V., Cheporov S.V. [Hemorheology (Experimental and Clinical Aspects)]. Yaroslavl: YSPU (Yaroslavl State Pedagogical University) Publishing House; 2009. 178 p.
9. Naumov A.V., Ledvanov M.Yu., Drozdov I.G. [Plague Immunology. Practice Guidance]. Saratov; 1992. 172 p.
10. Oborin V.A., Pimenov E.V., Ivonin A.G. [Analysis of adhesion of *Yersinia pestis* vaccine strain EV to erythrocytes of the animals using photocolorimetric method]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2010; 103:48–50.
11. Pimenov E.V., Oborin V.A., Ivonin A.G. [Investigation of mechanisms of interaction of *Yersinia pestis* EV NIEG vaccine strain bacteria with human red blood cells]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2012; 114:54–7.
12. Stepanshina V.N., Gremyakova T.A., Anisimov A.P., Potapov V.D. [Physico-chemical and biological pH 6 characteristics of *Yersinia pestis* antigen isolated by means of immuno-adsorption technique]. *Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol.* 1996; 3:12–7.
13. Feodorova V.A., Devdariani Z.L. The interaction of *Yersinia pestis* with erythrocytes. *J. Med. Microbiol.* 2002; 51(2):150–8.
14. Mertz P.M., Patti J.M., Marcin J.J., Marshall D.A. Model for studying bacterial adherence to skin wounds. *J. Clin. Microbiol.* 1987; 25(9):1601–4.
15. Perry R.D., Fetherston J.D. *Yersinia pestis* – etiologic agent of plague. *Clin. Microbiol. Rev.* 1997; 10:35–66.

Authors:

Pimenov E.V., Ivonin A.G. Laboratory of Comparative Cardiology of the Komi Scientific Center of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences (24, Kommunisticheskaya St., Syktyvkar, 167982, Russian Federation), Vyatka State Agricultural Academy (133, Oktyabr'sky Pr., Kirov, 610017, Russian Federation).

Oborin V.A. Vyatka State Humanities University. 26, Krasnoarmeiskaya St., Kirov, 610002, Russian Federation. E-mail: vaoborin50@mail.ru

Об авторах:

Пименов Е.В., Ивонин А.Г. Коми научный центр Уральского отделения Российской академии наук (Российская Федерация, 167982, Сыктывкар, ул. Коммунистическая, 24), Вятская государственная сельскохозяйственная академия (Российская Федерация, 610017, Киров, Октябрьский проспект, 133).

Оборин В.А. Вятский государственный гуманитарный университет. Российская Федерация, 610002, Киров, ул. Красноармейская, 26. E-mail: vaoborin50@mail.ru

Поступила 24.10.13.