

На правах рукописи

МУХТУРГИН
Геннадий Борисович

**ЗАКОНОМЕРНОСТИ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ КЛЕТОК
ИММУННОЙ СИСТЕМЫ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ЖИВОТНЫХ
С *YERSINIA PESTIS* РАЗНОГО ПЛАЗМИДНОГО СОСТАВА
(экспериментальное исследование)**

14.03.03 – патологическая физиология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание учёной степени
кандидата медицинских наук

Иркутск – 2020

Работа выполнена в Федеральном казённом учреждении здравоохранения «Иркутский ордена Трудового Красного Знамени научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (ФКУЗ Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора)

Научный руководитель:

доктор биологических наук

Дубровина Валентина Ивановна

Официальные оппоненты:

Семинский Игорь Жанович – доктор медицинских наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Иркутский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра патологической физиологии и клинической лабораторной диагностики, заведующий

Бодиенкова Галина Михайловна – доктор медицинских наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Восточно-Сибирский институт медико-экологических исследований», лаборатория иммуно-биохимических и молекулярно-генетических исследований в гигиене, заведующая

Ведущая организация: Федеральное казённое учреждение здравоохранения «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора)

Защита диссертации состоится « ____ » _____ 2020 года в ____ часов на заседании диссертационного совета Д 001.038.02 при Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека» по адресу: 664003, г. Иркутск, ул. Тимирязева, 16.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека» и на сайте www.health-family.ru.

Автореферат разослан « ____ » _____ 2020 г.

Учёный секретарь
диссертационного совета
доктор биологических наук



Гребенкина Людмила Анатольевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность. Чума – природно-очаговая особо опасная инфекционная болезнь, возбудителем которой является *Yersinia pestis*. Природные очаги этого тяжелейшего инфекционного заболевания встречаются в Евразии, на Африканском и Американском континентах. По данным ВОЗ только за пять лет (2010–2015) в мире зарегистрировано 3248 случаев заболевания людей чумой, из них 584 случая закончились смертью (ВОЗ, 2018). Современный период характеризует повышение эпизоотической активности в ряде природных очагов чумы (Aikimbayev A. M. et al., 2010; Балахонов С. В. и др., 2018; Popov N. V. et al., 2018; Sariyeva G. et al., 2018), возрастание вероятности распространения инфекции на энзоотичной территории и риск диссеминации чумы за её пределы, а также возможность применения возбудителя чумы в качестве агента биотерроризма (Li B., Yang R., 2008; Hammamieh R. et al., 2016; Балахонов С. В. и др., 2019). Увеличение миграции населения, коммерческий туризм, биотерроризм, военные конфликты и чрезвычайные ситуации в результате стихийных бедствий и техногенных катастроф усиливают не только потенциальную, но и реальную опасность завоза этой инфекции в любую страну мира (Wren B. W., 2003; Smiley S. T., 2008; Онищенко Г. Г., Кутырев В. В., 2009; Анисимов А. П., 2010; Попова А. Ю. и др., 2017; Балахонов С. В. и др., 2018).

На территории Российской Федерации зарегистрировано 11 природных очагов чумы. В настоящее время Горно-Алтайский высокогорный природный очаг, расположенный на территории Кош-Агачского района Республики Алтай, является одним из наиболее активных. Повышение эпидемического потенциала этого очага связывают с заносом и укоренением в местных биоценозах нетипичных для этой территории штаммов основного подвида *Y. pestis* subsp. *pestis* и общим ростом эпизоотической активности (Базанова Л. П. и др., 2013; Балахонов С. В. и др., 2014; Балахонов С. В. и др., 2016). В 2014–2016 гг. в Кош-Агачском районе Республики Алтай зарегистрировано три случая заболевания местных жителей бубонной чумой, что послужило основанием проведения комплекса профилактических мероприятий и научных исследований по изучению молекулярно-физиологических свойств возбудителя (Кутырев В. В. и др., 2013; Балахонов С. В. и др., 2014; Афанасьев М. В. и др., 2016; Балахонов С. В. и др., 2016). Все это обуславливает особое внимание к вопросам противодействия распространению, профилактики болезни и всестороннему изучению механизмов резистентности патогена от клеточного и гуморального звена врождённого иммунитета хозяина (Бугоркова С. А. и др., 2008; Витязева С. А., 2009; Дубровина В. И. и др., 2016; Попова А. Ю. и др., 2016; Анисимов А. П. и др., 2017; Подладчикова О. Н., 2017; Бугоркова С. А. и др., 2018; Половинкина В. С., 2018).

Степень разработанности темы исследования

Накопленные к настоящему времени материалы однозначно свидетельствуют о том, что патогенность возбудителя чумы является биологически сложным полидетерминантным признаком, находящимся под контролем регуляторных систем как хромосомных, так и плазмидных генов, которые ответственны за синтез макромолекул, принимающих участие как в развитии генерализованного инфекционного процесса, так и при бубонной форме чумы. Способность многих патогенных бактерий к паразитированию в фагоцитах, играющая важную роль в патогенезе инфекции, обусловлена в том числе и наличием у них плазмид вирулентности.

В связи с обострением эпидемиологической обстановки в Горно-Алтайском высокогорном природном очаге чумы особую актуальность приобретают исследования *Y. pestis* subsp. *pestis* и *Y. pestis* subsp. *altaica*, циркулирующих в Тувинском и Горно-Алтайском природных очагах, поскольку они имеют выраженные особенности и дискретность, обусловленные постоянным селективным воздействием различных биотических и абиотических факторов (Балахонов С. В. и др., 2014; Кутырев В. В. и др., 2014; Балахонов С. В. и др., 2016; Попова А. Ю. и др., 2016; Вержущий Д. Б., Балахонов С. В., 2016; Корзун В. М. и др., 2017; Попова А. Ю. и др., 2017). Одним из основных свойств, по которым проявляется атипизм фено- и генотипических свойств штаммов *Y. pestis*, изолированных в Горно-Алтайском природном очаге чумы, является обнаружение природных изолятов, не содержащих резидентных плазмид рYV и рYU в отдельные годы (Балахонов С. В., 2000; Логачев А. И. и др., 2004; Логачев А. И. и др., 2012). Отличительным признаком тувинских штаммов чумного микроба являются наличие в геноме дополнительной плазмиды рTP33. Высказано предположение, что рTP33 является кольцевым геномом фага, который содержит гены фагового морфогенеза, а также гены двухкомпонентной системы белков токсин-антитоксин YoeB/YefM, действующей на репликативный аппарат бактерий, а также, что она играет роль в процессе колонизации преджелудка блох, обеспечивая большую прочность экзополисахаридного матрикса биоплёнки (Оглодин Е. Г. и др., 2015; Афанасьев М. В. и др., 2016). Предположительно, белки, кодируемые этой плазмидой, являются факторами адаптации штаммов *Y. pestis* к условиям конкретных ландшафтно-географических биоценозов природных очагов чумы (Дентовская С. В. и др. 2006; Оглодин Е. Г. и др., 2015; Афанасьев М. В. и др., 2016; Балахонов С. В. и др., 2016). Возможно, плаزمида рTP33 играет роль в патогенности этих штаммов (Балахонов С. В., 2000; Оглодин Е. Г. и др., 2015; Афанасьев М. В. и др., 2016). Установлено, что атипичные варианты *Y. pestis* обладают способностью вызывать затяжные формы инфекционного процесса и, возможно, имеют значение в длительном поддержании энзоотии и сохранении возбудителя в межэпизоотический период (Parent M. A. et al., 2006; Лебедева С. А. и др., 2009).

Также показано, что зависимость между вирулентностью возбудителя и степенью выраженности индуцированной им иммунодепрессии, расценивается как важнейший фактор патогенности и является необходимым условием развития острого инфекционного процесса (Бугоркова С. А., 2008; Шмелькова Т. П., 2009). В связи с этим исследования, посвящённые изучению роли плазмид чумного микроба в организации его метаболического статуса и вирулентности, не утратили актуальность.

Исследования динамики изменений в органах периферической иммунной системы при чуме касаются, в основном морфофункциональной характеристики иммунокомпетентных органов у экспериментальных животных как при иммунизации вакцинным штаммом *Y. pestis* EV НИИЭГ, так и на фоне иммуномодуляции нанокompозитами, арабиногалактаном и полиоксидонием (Витязева С. А., 2009; Витязева С. А. и др., 2015; Бугоркова С. А., 2017). Участие центральных и периферических органов иммунной системы в реализации иммунных реакций и особенностей течения болезни, вызванной возбудителем чумы с разным составом плазмид, до настоящего времени мало исследованы.

Таким образом, сопоставление свойств штаммов, выделенных на территории Тувинского и Горно-Алтайского природных очагов и их изогенных вариантов, изучение молекулярно-физиологических механизмов взаимодействия чумного

микроба с разным плазмидным составом и клеток иммунной системы, а также морфофункционального состояния иммунокомпетентных органов помимо научного интереса к раскрытию механизмов и особенностей иммуно- и патогенеза чумы, будут способствовать пониманию и экспериментальному обоснованию факторов, обеспечивающих резистентность патогена к системам врождённого иммунитета хозяина.

Цель исследования

Выявить особенности взаимодействия клеток иммунной системы экспериментальных животных со штаммами *Y. pestis* в зависимости от их плазмидного состава.

Для реализации поставленной цели последовательно решались следующие задачи:

1. Оценить состояние кислородзависимого, нитроксидзависимого и кислороднезависимого метаболизма клеток фагоцитарной системы экспериментальных животных, инфицированных *Y. pestis* с разным плазмидным составом.

2. Выявить закономерности морфофункциональных изменений в иммунокомпетентных органах и популяционного состава клеток перитонеальной жидкости экспериментальных животных, инфицированных *Y. pestis* с разным плазмидным составом.

3. Установить особенности функционального состояния и субпопуляционного состава клеток крови белых мышей, инфицированных *Y. pestis* с разным плазмидным составом.

Научная новизна работы

Получены новые данные об антифагоцитарных и цитотоксических свойствах штаммов *Y. pestis*, изолированных в Тувинском и Горно-Алтайском природных очагах чумы, и их изогенных вариантов, проявляющихся разной способностью к разрушению перекиси водорода и адгезивной активности. Установлено, что высокие показатели перекись разрушающей активности чумного микроба характерны для бактерий с наличием плазмиды pYP, а адгезивной активности – pYV.

При проведении комплексного сравнительного исследования особенностей формирования резистентности организма экспериментальных животных (белых мышей и морских свинок) к штаммам *Y. pestis*, отличающихся по плазмидному профилю, выявлены различия по степени активации бактерицидного потенциала фагоцитов, пролиферации иммунокомпетентных клеток и дегрануляции тучных клеток.

Выявлены различия в морфологических изменениях иммунокомпетентных органов животных при экспериментальной чумной инфекции, которые проявляются разной степенью выраженности патологического процесса и активации иммунного ответа, зависящих от плазмидного состава *Y. pestis*.

Увеличение площади Т-зависимых зон в иммунокомпетентных органах белых мышей, инфицированных селекционными штаммами *Y. pestis* subsp. *altaica* и *Y. pestis* subsp. *pestis*, у которых отсутствуют плазмиды pYP и pYV свидетельствует об активации клеточного звена иммунитета и снижении плазмодитарной реакции.

Предложена и научно обоснована концептуальная схема механизмов действия чумного микроба с разным плазмидным спектром на функциональное состояние клеток иммунной системы.

Теоретическое и практическое значение работы

На основании проведенных исследований показано, что инфекционный процесс, вызванный введением белым мышам штаммов *Y. pestis* subsp. *pestis* с полным набором плазмид (pYP⁺pYV⁺pYT⁺pTP33⁺), в отличие от штаммов с отсутствием pYP, pYV или pYT проявляется тяжестью течения и гибелью животных на ранние сроки наблюдения (3–6-е сутки).

В ходе исследований получены новые данные о механизмах реализации патогенного потенциала, обусловленного особенностями плазмидного состава штаммов *Y. pestis*, изолированных в Тувинском и Горно-Алтайском природных очагах чумы и их изогенных вариантов, которые проявляются в антифагоцитарных и цитотоксических свойствах, адгезивной и общей перекись разрушающей активности чумного микроба.

Результаты сравнительного исследования позволили установить ряд важнейших параметров морфологических изменений в иммунокомпетентных органах экспериментальных животных в динамике инфекционного процесса, вызванного штаммами *Y. pestis* с разным плазмидным спектром, которые проявляются в различной степени активации бактерицидного потенциала фагоцитов, пролиферации клеток крови и их популяционном составе, а также дегрануляции тучных клеток.

Показано, что штаммы чумного микроба, у которых отсутствует одна из плазмид (pYP или pYV), имеют статистически значимо низкие показатели адгезивности, вызывают менее выраженные процессы дегрануляции тучных клеток, а также в отношении этих штаммов отмечено повышение показателей фагоцитарной и бактерицидной активности клеток иммунной системы (ФИП, НСТ-тест, МПО).

Эти данные дополняют теоретические знания и определяют направления изысканий в области изучения процесса формирования резистентности макроорганизма к возбудителю чумы. Полученные в ходе экспериментов данные могут быть использованы при изучении молекулярно-генетических механизмов патогенеза инфекционного процесса и направлений его развития.

Результаты исследований послужили основой для разработки и модификации методов изучения бактерицидных механизмов фагоцитоза и иммунной перестройки организма, которые отражены в методических рекомендациях – «Использование показателей адгезивной активности *Yersinia pestis* для оценки вирулентности» (Иркутск, 2012); «Фотометрическое определение поглотительной способности фагоцитов экспериментальных животных с применением 96-луночных плоскодонных планшет» (Иркутск, 2013); «Обеззараживание образцов крови, содержащих *Yersinia pestis*, для проведения цитофлуориметрических исследований» (Иркутск, 2015); «Определение протеолитической, супероксиддисмутазной и общей перекись разрушающей активности чумного микроба с применением фотометрического анализатора» (Иркутск, 2015).

Научные и практически значимые материалы исследований внедрены в практику научно-исследовательской работы ФКУЗ Иркутского научно-исследовательского противочумного института Роспотребнадзора, ФГБНУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека», филиала ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Минздрава РФ (г. Иркутск), включены в лекционные курсы при подготовке кадров учреждений Роспотребнадзора и других ведомств по программам дополнительного профессионального образования при ФКУЗ Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора.

Методология и методы исследования

В работе использованы частные и общенаучные методы исследования (биологические, микробиологические, биохимические, иммуноцитометрические, гистологические и статистические методы). Биологическим методом определяли иммунизирующую дозу и LD₅₀. Микробиологическими методами определяли обсеменённость органов экспериментальных животных в динамике инфекционного процесса. Биохимические методы включали определение бактерицидных механизмов фагоцитов экспериментальных животных. Иммуноцитометрическими методами определяли функциональную способность клеток крови экспериментальных животных. Гистологические методы включали изучение макро- и микрокартины, а также морфометрию структурных компонентов иммунокомпетентных органов. Все полученные материалы статистически обработаны стандартными методами.

Положения, выносимые на защиту

1. Антифагоцитарные и цитотоксические свойства штаммов *Y. pestis*, изолированных в Тувинском и Горно-Алтайском природных очагах чумы, и их изогенных вариантов проявляются разной способностью к разрушению перекиси водорода и адгезивной активностью. Высокие показатели перекись разрушающей активности чумного микроба характерны для штаммов бактерий с наличием плазмиды pYP, а адгезивная способность – pYV.

2. Морфологические изменения в иммунокомпетентных органах экспериментальных животных и дегрануляция тучных клеток при экспериментальной чумной инфекции зависят от плазмидного состава *Y. pestis*. Выявлены различия по степени активации фагоцитарного и бактерицидного потенциалов фагоцитов, которые обусловлены наличием pYP или pYV.

3. Субпопуляционный состав клеток крови белых мышей при экспериментальной чумной инфекции ассоциирован с плазмидным профилем чумного микроба. *Y. pestis* с полным набором плазмид оказывает существенное влияние на популяционный состав клеток крови экспериментальных животных, блокирует ключевые барьерные механизмы системы врождённого иммунитета (поглотительную способность фагоцитов и их бактерицидный потенциал), и препятствует формированию макроорганизмом полноценного адаптивного иммунитета.

Степень достоверности результатов и апробация работы

О достоверности результатов работы свидетельствует достаточный объем исследований с применением современных, высокочувствительных методов с автоматизированной оценкой и учётом результатов, адекватных методов статистической обработки полученных данных.

Материалы, изложенные в диссертации, обсуждены и представлены на: Международных научных конференциях «Современные проблемы зоонозных болезней» (Улан-Батор, 2010–2013); Всероссийском Конгрессе по инфекционным болезням (Москва, 2012–2013); Всероссийской научно-практической конференции молодых учёных «Фундаментальные и прикладные аспекты анализа риска здоровью населения» (Пермь, 2012); VIII Всероссийской научно-практической конференции молодых учёных и специалистов Роспотребнадзора «Современные проблемы эпидемиологии и гигиены» (Московская обл., 2016); XI Всероссийской научно-практической конференции молодых учёных и специалистов Роспотребнадзора

«Современные проблемы эпидемиологии, микробиологии и гигиены» (Уфа, 2019); Межрегиональных научно-практических конференциях молодых учёных и специалистов «Человек: здоровье и экология» (Иркутск, 2010–2011); «Биологическая безопасность в современном мире» (Оболенск, 2009); «Актуальные проблемы профилактической медицины, среды обитания и здоровья населения» (Уфа, 2013); научных конференциях Иркутского противочумного института (2010–2019).

В основу диссертационной работы положены исследования, проведённые в рамках трёх тем НИР института: «Особенности пато- и иммуногенеза экспериментальной чумной инфекции, вызванной *Y. pestis* с разным плазмидным составом» с № ГР 01201068223 (2011–2015 гг.) и результатов исследований, выполненных в рамках Отраслевой научно-исследовательской программы «Научные исследования и разработки с целью обеспечения санитарно-эпидемиологического благополучия и снижения инфекционной заболеваемости в Российской Федерации» (2011–2015 гг.) и Отраслевой научно-исследовательской программы «Проблемно-ориентированные научные исследования в области эпидемиологического надзора за инфекционными и паразитарными болезнями» (2016–2020 гг.) п. 6.3.2. «Исследование неизвестных ранее аспектов иммуногенеза и патогенеза при опасных инфекционных болезнях с целью совершенствования лечебных и профилактических мероприятий» (2016–2020 гг.).

Публикации

По теме диссертации опубликовано 15 научных работ, из которых 7 – в рецензируемых научных журналах и изданиях, определённых ВАК Минобрнауки России и 2 – в ведущих рецензируемых изданиях, индексируемых в международных базах данных Web of Science и Scopus.

Личный вклад соискателя

Автор непосредственно участвовал в проведении экспериментов, обобщении и анализе полученных результатов. В работах, выполненных в соавторстве, вклад автора является определяющим и заключается в непосредственном участии на всех этапах исследования: от постановки задач, их экспериментально-теоретической реализации до обсуждения результатов в научных публикациях и докладах.

Объём и структура работы

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, двух глав собственных исследований, заключения, выводов и списка литературных источников. Работа изложена на 139 страницах машинописного текста, иллюстрирована 7 таблицами и 20 рисунками. Список литературных источников содержит 230 наименований, в том числе 83 – зарубежных.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Экспериментальными моделями в основных опытах (иммунизация, заражение, отбор проб крови, получение фагоцитов и т. д.) служили сертифицированные животные (НПО «Вектор», Новосибирск РД 42-26-3...3738) – беспородные белые мыши (18–20 г) и морские свинки (250–300 г). Всего в опытах использовано 690 животных: 180 морских свинок, 510 белых мышей. Лабораторных животных выводили из эксперимента в соответствии с требованиями Хельсинской декларации Всемирной медицинской ассоциации «Этические принципы проведения научных

исследований с участием человека в качестве субъекта» (1964 г.) и её последующими редакциями (1975, 1983, 1989, 1996, 2000, 2004, 2008, 2013 гг.), международными рекомендациями (этический кодекс) по проведению медико-биологических исследований с использованием животных (CIOMS, Geneva, 1985), Европейской Конвенцией о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях (Страсбург, 18.03.1986 г.), решением Совета Евразийской экономической комиссии от 03.11.2016 г. № 79 «Об утверждении правил надлежащей клинической практики Евразийского экономического союза» и «Правил надлежащей лабораторной практики», утверждённых приказом Министерства здравоохранения от 01.04.2016 года № 199н. Количество животных для опыта подбирали с учётом получения статистически значимых результатов. Эксперименты проводили в 2–3 повторах. В качестве контроля использовали клетки интактных животных.

Для комплексного сравнительного исследования механизмов реализации патогенного потенциала *Y. pestis*, обусловленного особенностями плазмидного состава возбудителя чумы, циркулирующего в Тувинском и Горно-Алтайском природных очагах чумы, проведены эксперименты с использованием штаммов *Y. pestis* subsp. *pestis* И-2638 и *Y. pestis* subsp. *pestis* И-3560 (pYP⁺pYV⁺pTP33⁺pYT⁺), его производных с отсутствием плазмид pYP и/или pYV (*Y. pestis* subsp. *pestis* И-3480 (pYP-pYV-pTP33⁺pYT⁺); *Y. pestis* subsp. *pestis* И-3479 (pYP+pYV-pTP33⁺pYT⁺), а также *Y. pestis* subsp. *altaica* И-2359 (pYP⁺pYV⁺pYT⁺), *Y. pestis* subsp. *altaica* И-2948 (pYP⁻pYV⁺pYT⁺) и селекционированным от него *Y. pestis* subsp. *altaica* И-2948/3 (pYP⁻pYV⁻pYT⁺). Плазмидный состав взятых в исследование штаммов возбудителя чумы, циркулирующего в Тувинском и Горно-Алтайском природных очагах, подтверждён методом электрофоретического анализа и ПЦР сотрудниками отдела микробиологии чумы ФКУЗ Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора.

При изучении фагоцитарной активности клеток иммунной системы использовали переживающую однослойную культуру (Фрейдлин И. С., 1984, 1986) перитонеальных макрофагов (ПМ) и полиморфноядерных лейкоцитов (ПЯЛ). К суспензии клеток концентрацией $2 \cdot 10^7$ /мл вносили исследуемую суспензию культуры клеток чумного микроба в соотношении 50:1 и инкубировали 60 мин при 37 ± 1 °С. Для оценки интенсивности образования в индуцированных клетках метаболитов кислорода, использовали НСТ-тест. Активность глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (Г6ФДГ, КФ 1.1.1.49), супероксиддисмутазы (СОД, КФ 1.15.1.1), миелопероксидазы (МПО, КФ 1.11.1.7), содержание неферментных катионных белков (НКБ) определяли спектрофотометрическим методом (Дубровина В. И. и др. 2008). Степень активизации тучных клеток (ТК) оценивали по индексу дегрануляции клеток (ИДТК) – процентное соотношение дегранулированных тучных клеток к их общему числу (Красноженов Е. П., Федоров Ю. В., 1996; Витязева С. А. и др., 2010).

Результаты реакций учитывали на автоматическом 8-канальном ридере для 96 луночных микропланшет и стрипов BIO-TEK INSTRUMENTS INC (США) по унифицированному способу и выражали в виде индекса стимуляции фагоцитов (ИС), который вычисляли как соотношение величин оптической плотности в опытной и контрольной пробах и выражали в процентах.

Анализ субпопуляционного состава клеток крови экспериментальных животных проводили методом проточной цитометрии на приборе BD FACSCanto™ II в программе BD Diva 6.0, собирая 10 000 событий для каждой пробы. Для изучения

клеточного звена иммунной системы определяли следующие субпопуляции Т-лимфоцитов: общее содержание активированных Т-лимфоцитов ($CD3^+CD25^+$), общее содержание активированных Т-хелперов ($CD3^+CD4^+CD25^+$), популяции активированных Т-хелперов ($CD3^+CD4^+CD25^{low}$ и $CD3^+CD4^+CD25^{high}$), активированные цитотоксические Т-лимфоциты ($CD3^+CD8^+CD25^+$), нативные Т-хелперы ($CD3^+CD4^+CD25^-$), нативные цитотоксические Т-лимфоциты ($CD3^+CD8^+CD25^-$). В рамках циркулирующей популяции В-лимфоцитов оценивали содержание клеточных линий: $CD38^-CD138^-$, $CD38^+CD138^-$, $CD38^-CD138^+$, $CD38^+CD138^+$. Индекс содержания (Ис) рассчитывали как соотношение величин клеток в опытной и контрольной пробах и выражали в процентах.

Статистическую обработку данных проводили при помощи стандартного пакета прикладных программ Statistica, версия 6.1 (©StatSoft, Inc., 19842001, ИПЧИ 31415926535897). При анализе данных определяли тип распределения с помощью тестов Колмогорова – Смирнова, Лиллиефорса и Шапиро – Уилка. Однородность дисперсий оценивали по критерию Левена. Для решения проблемы множественных сравнений статистическую обработку средних величин проводили с использованием критерия ANOVA. Для определения статистической значимости различий путём попарного сравнения групп использовали t-критерий Стьюдента для независимых выборок с поправкой Бонферрони и F-критерий. Данные представлены в виде среднего арифметического \pm среднее квадратичное отклонение. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,01$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Антифагоцитарные свойства штаммов *Yersinia pestis* с разным плазмидным составом

Главными причинами, лимитирующими реализацию бактерицидного потенциала фагоцитов интактных и иммунизированных морских свинок, является ингибирование чумным микробом процесса конъюгации фагосом с лизосомами, устойчивость к действию лизосомальных ферментов, способность после эндоцитоза покидать фагосому, избегая действия микробицидных факторов, благодаря чему обеспечивается возможность длительное время персистировать в цитоплазме фагоцитов, что и объясняет незавершённый характер фагоцитоза (Дубровина В. И., 2004; Бугоркова С. А., 2008; Витязева С. А., 2009; Дубровина В. И. и др., 2016). В связи с этим на первом этапе исследований нами проведено сравнительное изучение цитотоксических и адгезивных свойств штаммов, различающихся по плазмидному спектру.

При изучении антифагоцитарных и цитотоксических свойств показано, что штаммы *Y. pestis* обладают супероксиддисмутазной активностью, но её уровень не зависит от их плазмидного состава. Обнаружены различия в общей перекись разрушающей активности (ОПРА) экстрактов клеток *Y. pestis*, содержащих плазмиду pYV и не имеющих таковой.

В отношении ОПРА нами обнаружены различия между исследованными штаммами, которые можно представить в следующем виде (Рисунок 1).

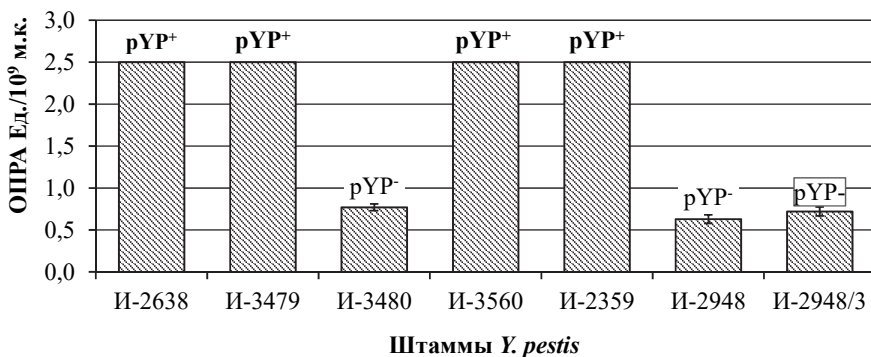


Рисунок 1 – Общая перекись разрушающая активность *Y. pestis* с разным плазмидным составом

При изучении адгезивных свойств всех штаммов *Y. pestis*, отобранных для комплексного исследования выявлены различия в способности чумного микроба фиксироваться на поверхности эритроцитов (Рисунок 2). Максимальные показатели коэффициента адгезии (КА) установлены у штамма с полным набором плазмид (*Y. pestis* subsp. *pestis* И-2638).

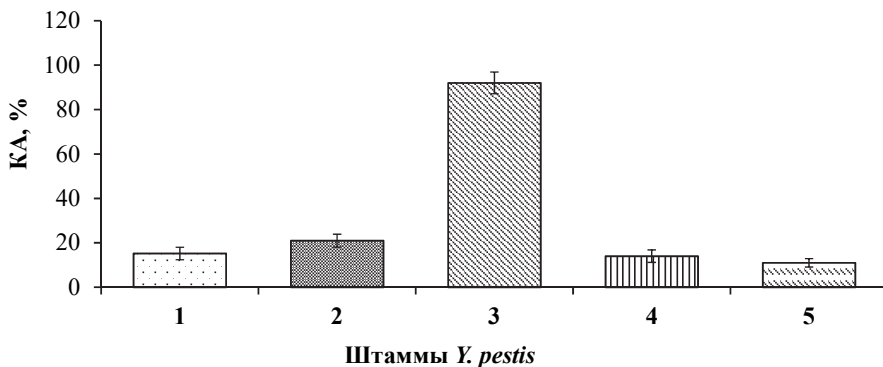


Рисунок 2 – Адгезивная активность чумного микроба в отношении эритроцитов белых мышей в условиях *in vitro* (КА, %). 1 – *Y. pestis* subsp. *altaica* И-2948/3; 2 – *Y. pestis* subsp. *altaica* И-2359; 3 – *Y. pestis* subsp. *pestis* И-2638; 4 – *Y. pestis* subsp. *pestis* И-3479; 5 – *Y. pestis* subsp. *pestis* И-3480

Установлено, что штаммы *Y. pestis*, утратившие плазмиду вирулентности (pYV⁻) имеют статистически значимо низкие показатели адгезивности по сравнению со штаммами *Y. pestis* с наличием данной плазмиды (pYV⁺). Тем не менее, поглотительная способность фагоцитов лабораторных животных в отношении штаммов *Y. pestis* с неполным набором плазмид в 1,5–2,0 раза выше ($p < 0,05$).

Таким образом, на основании полученных в ходе экспериментов данных показано, что супероксиддисмутазная активность исследованных штаммов *Y. pestis*,

выделенных в Горном-Алтайском и Тувинском очагах, и их изогенных субкультур не зависит от плазмидного состава. Все изученные штаммы чумного микроба и их изогенные варианты, отличающиеся по плазмидному профилю, обладают общей перекись разрушающей активностью, степень которой зависит от наличия в геноме плазмиды рУР.

Оценка состояния клеток иммунной системы экспериментальных животных при взаимодействии с *Yersinia pestis* исходных и дефектных по плазмидному составу штаммов

В качестве модели в условиях *in vitro* и *in vivo* были выбраны клетки иммунной системы: макрофаги и полиморфноядерные лейкоциты (ПЯЛ) восприимчивых к чуме экспериментальных животных – белых мышей и морских свинок.

Показана высокая поглотительная способность фагоцитов морских свинок *in vitro* в отношении *Y. pestis* subsp. *altaica* И-2948 (рУР⁺рУV⁺рУТ⁺). Наименьшие значения фагоцитарного индекса поглощения (ФИП) выявлены у ПМ, примированных высоковирулентными штаммами *Y. pestis* subsp. *pestis* И-2638 и *Y. pestis* И-3560 (рУР⁺рУV⁺рТР33⁺рУТ⁺). Штамм *Y. pestis* И-2359 (рУР⁺рУV⁺рУТ⁺) по данному показателю занимал промежуточное положение (Рисунок 3), что позволяет предположить опосредованное участие плазмиды рТР33 в ингибировании механизмов фагоцитоза.

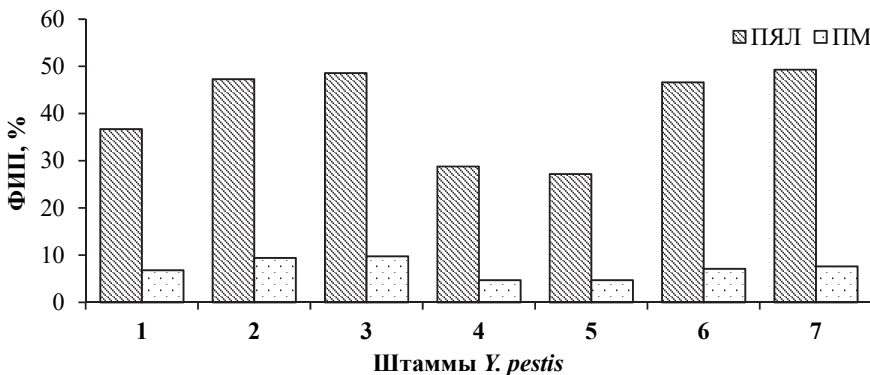


Рисунок 3 – Поглотительная способность фагоцитов в условиях *in vitro* (ФИП, %).

1 – *Y. pestis* И-2359; 2 – *Y. pestis* subsp. *altaica* И-2948; 3 – *Y. pestis* subsp. *altaica* И-2948/3; 4 – *Y. pestis* subsp. *pestis* И-2638; 5 – *Y. pestis* subsp. *pestis* И-3560; 6 – *Y. pestis* subsp. *pestis* И-3479; 7 – *Y. pestis* subsp. *pestis* И-3480

В ходе экспериментов установлено повышение показателей фагоцитарной и бактерицидной активности клеток иммунной системы (ФИП, НСТ-тест, МПО) в отношении штаммов *Y. pestis* И-2948/3, *Y. pestis* И-3479, *Y. pestis* И-3480 по сравнению с *Y. pestis* И-2638 и *Y. pestis* И-3560, что может быть связано с утратой первой группы штаммов плазмид рУV и рУР или одной из них. Увеличение в 5,0–7,0 раз ($p < 0,05$) эффекторного потенциала ПЯЛ при контакте с чумным микробом по сравнению с перитонеальными макрофагами свидетельствует о возможной более интенсивной активации раннего индуцибельного ответа этих клеток. Кроме того, штаммы *Y. pestis* с полным набором плазмид, в отличие от их изогенных вариантов, как показано в

экспериментах, ингибируют высвобождение неферментных катионных белков из гранул ПЯЛ (Рисунок 4), что может приводить к снижению их бактерицидного действия.

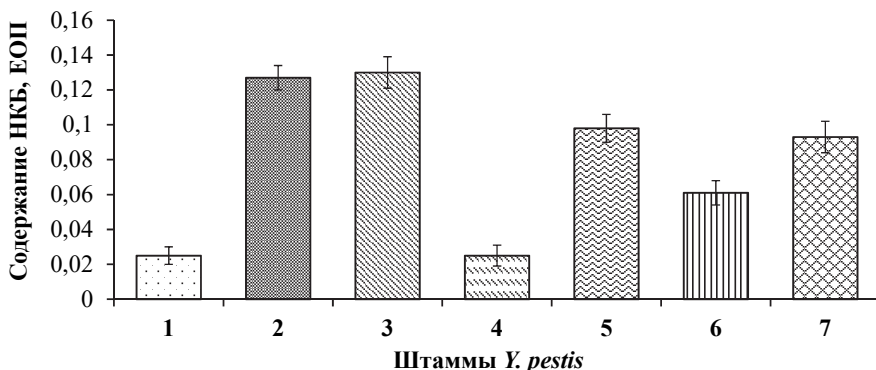


Рисунок 4 – Влияние чумного микроба на кислороднезависимые бактерицидные системы ПЯЛ. 1 – *Y. pestis* И-3560; 2 – *Y. pestis* subsp. *altaica* И-2948; 3 – *Y. pestis* subsp. *altaica* И-2948/3; 4 – *Y. pestis* subsp. *pestis* И-2638; 5 – *Y. pestis* subsp. *pestis* И-3479; 6 – *Y. pestis* subsp. *pestis* И-3480; 7 – контроль (интактные клетки)

Подобную картину установили Е.В. Сазанова с соавторами (2017) при изучении цитотоксического воздействия штаммов *Y. pestis* с различной степенью вирулентности на лейкоциты цельной дефибринированной крови человека.

Таким образом, в результате проведенных в условиях *in vitro* экспериментов показаны различия в характере действия на кислородзависимые и кислороднезависимые бактерицидные системы фагоцитов (ПЯЛ, ПМ) штаммов, выделенных в Горно-Алтайском и Тувинском природных очагах, различающихся по плазмидному составу и вирулентности для лабораторных животных. Разная степень действия тестируемых штаммов чумного микроба на бактерицидные системы фагоцитов, по-видимому, обусловлена их плазмидным составом. Немаловажную, на наш взгляд роль в этих процессах играет отсутствие плазмиды кальцийзависимости, которая может обуславливать способность вирулентных штаммов ингибировать и утилизировать действие активных форм кислорода, образуемых в процессе респираторного взрыва. Вероятно, плазида пестициногенности также может опосредовано влиять на антимикробные свойства фагоцитов, поскольку изогенные варианты тувинского штамма, утратившие эту плазмиду не способны противостоять киллерному воздействию полиморфноядерных лейкоцитов.

Популяционный состав клеток крови и перитонеальной жидкости лабораторных животных при экспериментальной чумной инфекции

Установлены различия в количественном и качественном составе тучных клеток перитонеальной жидкости белых мышей, инфицированных *Y. pestis* с разным плазмидным составом. Показано, что штаммы чумного микроба, у которых отсутствует одна из плазмид (pYP или pYV), вызывают менее выраженные процессы дегрануляции этих клеток, характеризующие формирование неполноценного иммунного ответа макроорганизма (Анисимов А. П., 2002; Каграманов В. С. и др., 2006).

Самый высокий индекс дегрануляции тучных клеток (ИДТК) отмечается у белых мышей через 60 мин после заражения штаммами с полным набором плазмид *Y. pestis* subsp. *pestis* И-2638 (Рисунок 5) и *Y. pestis* subsp. *pestis* И-3560, который составляет – $3,9 \pm 0,6$ и $3,8 \pm 0,4$, что в среднем в 18,5 раза ($p < 0,01$) выше ИДТК у интактных животных ($0,20 \pm 0,03$).

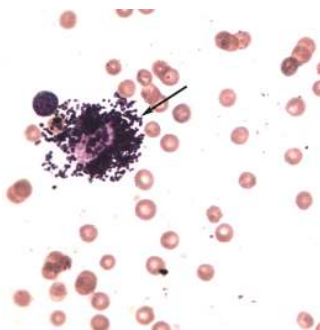


Рисунок 5 – Дегрануляция тучных клеток перитонеальной жидкости белой мыши, инфицированной *Y. pestis* subsp. *pestis* И-2638. Окраска по Романовскому – Гимза, ув. 10×100

Отмечена тенденция к снижению этого показателя к 120 мин и статистически значимое повышение к 180 мин наблюдения, когда ИДТК превышает значения в контрольной группе в среднем в 4,4 раза ($p < 0,01$).

Таким образом, развитие инфекционного процесса в первые часы (1–2 часа) 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 инфицировании их штаммами с наличием $pYR^+pYV^+pYT^+$.

Выявленная в ходе эксперимента фазность в изменении количественного состава тучных клеток перитонеальной жидкости, особенно у особей, инфицированных вирулентным штаммом *Y. pestis* subsp. *pestis* И-2638 ($pYR^+pYV^+pTP33^+pYT^+$), а также наличие незрелых и атипичных форм ТК свидетельствует, по-видимому, о развитии приспособительно-компенсаторных процессов.

Известно, что ранний маркер активации Т-лимфоцитов (CD25) является высокоаффинным рецептором к ИЛ-2, который в свою очередь усиливает пролиферацию Т-лимфоцитов. Основная функция В-клеток – эффекторное участие в гуморальных иммунных реакциях, дифференциация в результате антигенной стимуляции в плазматические клетки (ПК), продуцирующие антитела (Петров Р. В., 2011; Литвинова Л. С. и др., 2014). В связи с этим, следующим этапом наших исследований стало изучение действия чумного микроба с различным плазмидным спектром на пролиферацию иммунокомпетентных клеток и их популяционный состав.

Установлено, что все исследованные штаммы чумного микроба, не зависимо от их плазмидного состава, в условиях *in vitro* способствуют повышению экспрессии CD25 В-клетками крови экспериментальных животных в 2,5 раза по сравнению с контролем (интактные животные). Выявлены различия в активации Т-лимфоцитов

крови, в частности Т-хелперов, под действием *Y. pestis* с разным плазмидным составом (Таблица 1).

Таблица 1 – Показатели процентного содержания субпопуляций Т-лимфоцитов у мышей, получивших культуру *Y. pestis* с разным плазмидным составом (Mean ± SD)

Штамм	Сутки	Т-лимфоциты (CD3 ⁺)	Т-хелперы (CD3 ⁺ CD4 ⁺)	Цитотоксические Т-лимфоциты (CD3 ⁺ CD8 ⁺)
Контроль		62,52 ± 8,49	43,07 ± 6,18	12,13 ± 1,11
<i>Y. pestis</i> subsp. <i>pestis</i> И-2638	1	66,23 ± 4,88	38,39 ± 8,13	11,07 ± 2,32
	2	38,40 ± 4,71**	25,26 ± 1,10**	7,71 ± 1,28**
	3	47,47 ± 3,65**	37,89 ± 1,12	8,82 ± 1,33*
<i>Y. pestis</i> subsp. <i>pestis</i> И-3560	1	62,51 ± 2,27	39,50 ± 0,82	10,39 ± 0,81*
	2	50,85 ± 5,03**	30,88 ± 6,02**	10,94 ± 0,70
	3	50,11 ± 2,42**	37,73 ± 5,64	11,07 ± 1,72
<i>Y. pestis</i> subsp. <i>pestis</i> И-3479	3	48,58 ± 5,07**	34,13 ± 7,81*	13,36 ± 1,55
	7	60,83 ± 2,35	45,36 ± 4,29	15,05 ± 1,54
	14	60,80 ± 6,96	42,35 ± 8,96	14,69 ± 1,87
<i>Y. pestis</i> subsp. <i>pestis</i> И-3480	21	60,77 ± 11,07	47,42 ± 9,66	14,25 ± 2,52
	3	67,39 ± 3,60	47,84 ± 5,64	13,91 ± 2,80
	7	71,4 ± 8,42*	46,58 ± 4,34	14,81 ± 1,83
<i>Y. pestis</i> subsp. <i>pestis</i> И-3480	14	59,73 ± 4,15	40,54 ± 2,78	14,35 ± 2,54
	21	64,89 ± 2,07	53,09 ± 3,24	10,56 ± 2,93
	3	59,85 ± 3,03	46,31 ± 4,86	11,08 ± 2,14
<i>Y. pestis</i> subsp. <i>altaica</i> И-2359	7	71,38 ± 10,90	42,89 ± 2,72	16,43 ± 3,35*
	14	61,17 ± 2,95	38,41 ± 5,38	12,02 ± 3,02
	21	64,33 ± 4,25	41,06 ± 2,87	12,91 ± 1,37
<i>Y. pestis</i> subsp. <i>altaica</i> И-2948	3	66,50 ± 1,34	46,18 ± 7,14	12,85 ± 3,21
	7	67,70 ± 15,70	34,54 ± 1,55**	12,62 ± 0,77
	14	56,81 ± 3,71	39,23 ± 3,80	11,49 ± 2,38
<i>Y. pestis</i> subsp. <i>altaica</i> И-2948/3	21	57,57 ± 11,29	41,82 ± 4,15	12,82 ± 0,10
	3	60,67 ± 4,47	45,62 ± 3,09	13,79 ± 3,00
	7	70,19 ± 9,70	41,84 ± 5,86	13,19 ± 0,44
<i>Y. pestis</i> subsp. <i>altaica</i> И-2948/3	14	61,32 ± 6,56	42,50 ± 2,81	12,73 ± 2,89
	21	67,00 ± 4,25	45,89 ± 0,88	13,87 ± 2,93

Примечание. * – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$ по сравнению с контролем.

При оценке субпопуляционного состава лимфоцитов крови у мышей, инфицированных всеми исследованными штаммами, только в случае введения животным культур селекционных штаммов *Y. pestis* subsp. *pestis* И-3479 (pYV⁻) и *Y. pestis* subsp. *pestis* И-3480 (pYP-pYV⁻) на 7-е и 14-е сутки установлено увеличение процентного содержания CD3⁺CD19⁺-клеток (Рисунок 6).

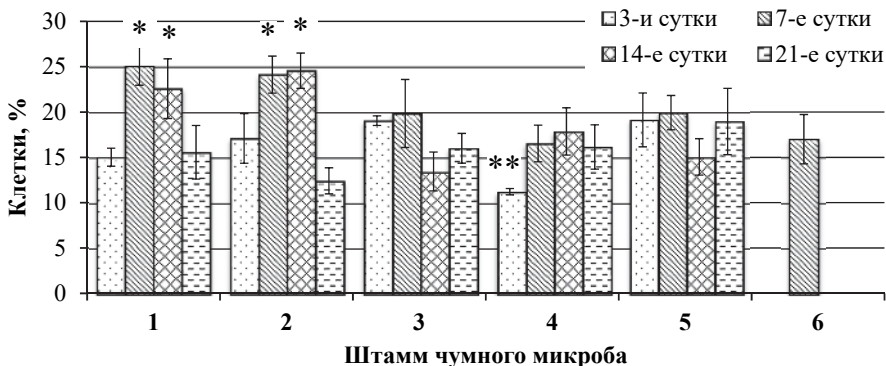


Рисунок 6 – Процентное содержание В-лимфоцитов в крови экспериментальных животных в динамике экспериментальной чумной инфекции, вызванной *Y. pestis* с разным плазмидным составом (Mean \pm SD). 1 – *Y. pestis* subsp. *pestis* И-3479; 2 – *Y. pestis* subsp. *pestis* И-3480; 3 – *Y. pestis* subsp. *altaica* И-2359; 4 – *Y. pestis* subsp. *altaica* И-2948; 5 – *Y. pestis* subsp. *altaica* И-2948/3; 6 – контроль.
* – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$, *** – $p < 0,001$ по сравнению с контролем.

Анализ взаимосвязи клеточного состава крови и плазмидного профиля чумного микроба показал, что на ранних сроках инфекционного процесса повышение содержания гранулоцитов ($r = -0,66$, $p = 0,027$), а также снижение числа лимфоцитов ($r = 0,71$, $p = 0,014$) связано с наличием у возбудителя плазмиды rYV . Отсутствие изменений абсолютного содержания количества лимфоцитов у мышей, инфицированных изогенными штаммами *Y. pestis* subsp. *pestis* И-3480 (rYV^-) и *Y. pestis* subsp. *altaica* И-2948/3 (rYV^-), а также атипичным – штаммом *Y. pestis* subsp. *altaica* И-2948 (rYV^-), может быть связано с отсутствием плазмиды rYV ($r = 0,74$, $p = 0,009$). Штаммы, лишённые данной плазмиды, не оказывают статистически значимого влияния на снижение популяции Т-лимфоцитов ($r = 0,68$, $p = 0,021$). Содержание В-лимфоцитов в крови у животных при экспериментальной чумной инфекции не зависит от плазмидного состава взятого для исследования штамма.

Инфекционный процесс, вызванный штаммами с полным набором плазмид (*Y. pestis* subsp. *pestis* И-3560, *Y. pestis* subsp. *pestis* И-2638), сопровождается существенными изменениями состава клеточных популяций в иммунокомпетентных органах. В случае мышей, инфицированных *Y. pestis* subsp. *pestis* И-3560 и *Y. pestis* subsp. *pestis* И-2638, неблагоприятным прогностическим признаком может рассматриваться сочетание лейко- и лимфопении, что возможно связано с высокой вирулентностью данных штаммов ($LD_{50} = 4-10$ м.к.).

Морфологические изменения в иммунокомпетентных органах белых мышей при экспериментальной чумной инфекции

При оценке патоморфологической картины лимфатических узлов и селезёнки лабораторных животных, инфицированных *Y. pestis* с разным плазмидным спектром, патологические изменения характеризуются разной степенью выраженности.

Сравнительный анализ показал, что инфекционный процесс, вызванный введением белым мышам *Y. pestis* subsp. *pestis* И-2638 и *Y. pestis* subsp. *pestis* И-3560

(pY^r+pYV^r+pYT^r+pTP33⁺) вызывает у животных тяжёлый инфекционный процесс в отличие от штаммов с неполным набором плазмид (*Y. pestis* subsp. *altaica* И-2948/3, *Y. pestis* subsp. *pestis* И-3480). Важно отметить, что штамм *Y. pestis* И-2359 (pTP33⁻) вызывает слабо выраженное развитие инфекционного процесса у экспериментальных животных.

Наблюдаемые в ходе исследования изменения со стороны иммунокомпетентных органов животных, инфицированных возбудителем чумы основного подвида *Y. pestis* subsp. *pestis* И-2638 и *Y. pestis* subsp. *pestis* И-3560 (pY^r+pYV^r+pYT^r+pTP33⁺), указывает на отсутствие сопротивляемости организма белых мышей на внедрение патогена. Инфекционный процесс в этих случаях приводит к гибели животных в ранние сроки наблюдения (3–4-е сутки). При микроскопическом исследовании в регионарном лимфатическом узле животных, инфицированных штаммами *Y. pestis* subsp. *pestis* И-2638 и *Y. pestis* subsp. *pestis* И-3560, имеет место полнокровие сосудов, а лимфатические фолликулы гиперплазированы. Развитие некроза выявлено на 3-и сутки.

Морфометрическое исследование селезёнки показало уменьшение доли белой пульпы за счёт редукции фолликулов и некроза их клеточных элементов на 1-е и 3-и сутки по сравнению с контролем (интактные животные). Выявлена пролиферация макрофагов и мегакариоцитов, а также показано, что количество ПК превосходит значения в контроле в 4–5 раз ($p < 0,05$). Инфекционный процесс, вызванный культурами этих штаммов, развивается очень быстро, сопровождаясь высокой интоксикацией, приводит к летальным исходам уже к 5-м суткам. Иммунологическая перестройка организма в этом случае не успевает развиваться.

Максимальные изменения соотношения структурных компонентов лимфатических узлов у белых мышей, инфицированных штаммами с не полным набором плазмид: *Y. pestis* subsp. *pestis* И-3479, *Y. pestis* subsp. *pestis* И-3480 и *Y. pestis* subsp. *altaica* И-2948/3 выявлены на 3-и сутки наблюдения по сравнению с контролем (интактные животные). При этом увеличение абсолютного числа ПК выявлено на 7-е сутки (Рисунок 7).

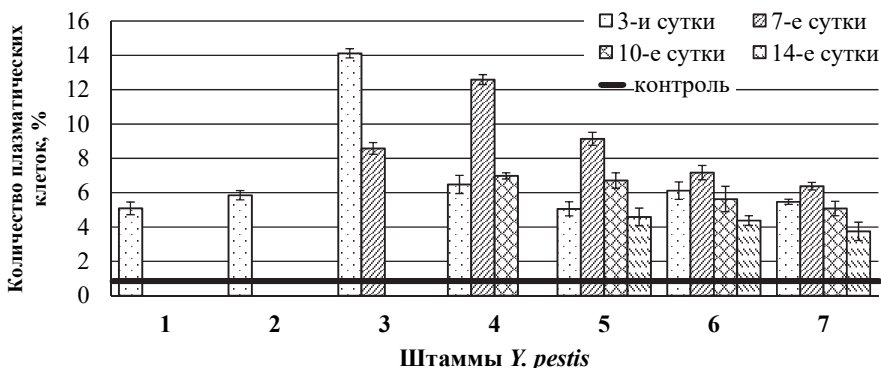


Рисунок 7 – Количество плазматических клеток в мозговых телях регионарных лимфатических узлов белых мышей, инфицированных *Y. pestis* с разным плазмидным составом. 1 – *Y. pestis* subsp. *pestis* И-2638; 2 – *Y. pestis* subsp. *pestis* И-3560; 3 – *Y. pestis* subsp. *altaica* И-2359; 4 – *Y. pestis* subsp. *altaica* И-2948; 5 – *Y. pestis* subsp. *pestis* И-3479; 6 – *Y. pestis* subsp. *pestis* И-3480; 7 – *Y. pestis* subsp. *altaica* И-2948/3.

Установлено увеличение объёмной доли белой пульпы селезёнки по отношению к красной у опытных животных, инфицированных штаммами *Y. pestis* subsp. *pestis* И-3479, *Y. pestis* subsp. *pestis* И-3480 и *Y. pestis* subsp. *altaica* И-2948/3, на 7-е сутки за счёт увеличения периартериальной зоны (Т-зависимой зоны) с последующим снижением к 14-м суткам (Рисунок 8).

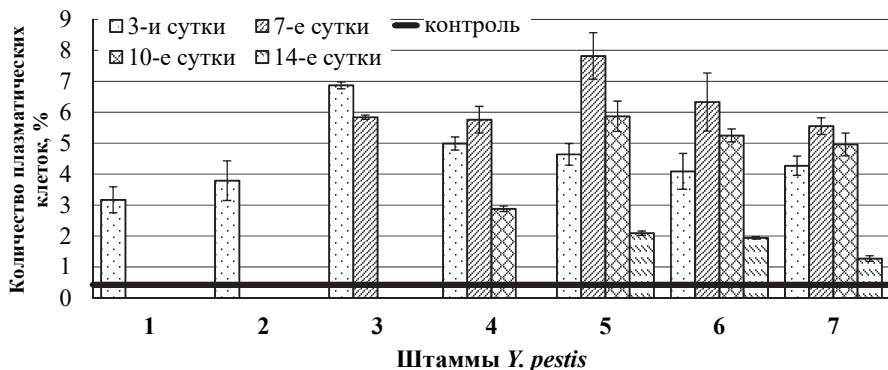


Рисунок 8 – Количество плазматических клеток в селезёнке белых мышей, инфицированных *Y. pestis* с разным плазмидным составом. 1 – *Y. pestis* subsp. *pestis* И-2638; 2 – *Y. pestis* subsp. *pestis* И-3560; 3 – *Y. pestis* subsp. *altaica* И-2359; 4 – *Y. pestis* subsp. *altaica* И-2948; 5 – *Y. pestis* subsp. *pestis* И-3479; 6 – *Y. pestis* subsp. *pestis* И-3480; 7 – *Y. pestis* subsp. *altaica* И-2948/3.

В белой пульпе селезёнки опытных животных максимальное количество ПК отмечается на 7-е сутки. Увеличение площади Т-зависимых зон в иммунокомпетентных органах белых мышей, инфицированных селекционными штаммами *Y. pestis* с отсутствием плазмид рYV и рYP (*Y. pestis* subsp. *altaica* И-2948/3, *Y. pestis* subsp. *pestis* И-3480) и рYV (*Y. pestis* subsp. *pestis* И-3479), свидетельствует об активации клеточного звена иммунитета.

Таким образом, разная степень активации иммунного ответа и выраженность патологического процесса, вызванного штаммами *Y. pestis* с разным плазмидным спектром, проявляются особенностями морфологических изменений в иммунокомпетентных органах (лимфатические узлы, селезёнка), которые связаны с наличием или отсутствием у возбудителя плазмиды рYV. Кроме того, нами показано, что возбудитель *Y. pestis*, обладающий тремя основными плазмидами (рYP, рYV, рYT), вызывает у животных острую генерализованную форму заболевания, которая, как правило, заканчивается летальным исходом. Утрата плазмид вирулентности (рYV) и патогенности (рYP), замедляет развитие инфекционного процесса и вызывает гибель экспериментальных животных в более поздние сроки (Дубровина В. И. и др., 2017).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Кратко резюмируя изложенные выше материалы, можно констатировать, что выявленные в ходе исследований особенности субпопуляционного состава клеток крови белых мышей, инфицированных штаммами чумного микроба основного

и алтайского подвидов и их изогенных вариантов, в большинстве своём ассоциированы с плазмидным профилем *Y. pestis*.

В процессе проведённого исследования получены новые данные о механизмах реализации патогенного потенциала чумного микроба, обусловленного особенностями плазмидного состава штаммов *Y. pestis*. Выявлены отличия в антифагоцитарных и цитотоксических свойствах, адгезивной и общей перекисью разрушающей активности чумного микроба, которые при взаимодействии с макроорганизмом проявляются в различной степени активации поглотительной способности, бактерицидного потенциала клеток иммунной системы, пролиферации клеток крови и их популяционного состава, а также в дегрануляции тучных клеток.

Результаты сравнительного исследования позволили установить ряд важнейших параметров морфологических изменений в иммунокомпетентных органах, касающихся активации иммунного ответа и выраженности патологического процесса, экспериментальных животных, инфицированных штаммами *Y. pestis* с разным плазмидным спектром.

На основании вышеизложенного и данных литературы нами предложена концептуальная схема закономерностей изменений функционального состояния клеток иммунной системы под действием чумного микроба с разным набором плазмид (Рисунок 9), суть которой заключается в следующем: развитие инфекционного процесса в первые часы после введения *Y. pestis*, а также бактерицидный потенциал клеток иммунной системы и субпопуляционный состав клеток крови ассоциированы с плазмидным профилем чумного микроба.

Активированные моноциты синтезируют ИЛ-1 α , оказывающий аутокринное действие, а также способствующий активации Т-лимфоцитов, синтезирующих В-клеточный ростовой фактор (ИЛ-4). ФНО- α , действуя синергично с ИЛ-12, повышает функциональную активность цитотоксических Т-лимфоцитов и их способность к разрушению инфицированных бактериями клеток, что ведёт к элиминации возбудителя. В динамике инфекционного процесса, вызванного *Y. pestis* с разным плазмидным спектром, активируется пролиферация иммунокомпетентных клеток и модуляция апоптоза.

Утрата одной или нескольких плазмид, в частности, плазмид вирулентности (pYV) и патогенности (pYP) снижает скорость генерализации инфекционного процесса и способность возбудителя вызывать патологические изменения несовместимые с жизнью.

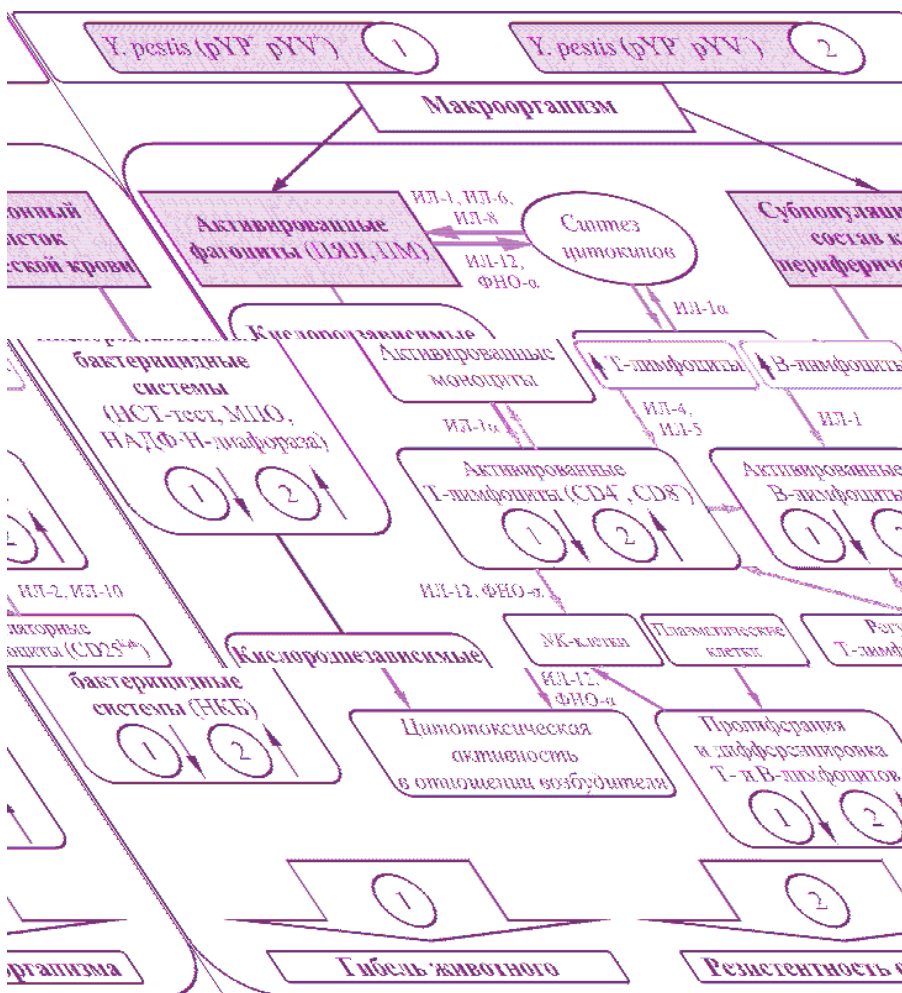


Рисунок 9 – Концептуальная схема, включения бактерицидных механизмов фагоцитоза чумного микроба с разным плазмидным спектром в эксперименте. Примечание: данные литературы выделены курсивом.

ВЫВОДЫ

1. Штаммы *Y. pestis*, у которых отсутствует одна из плазмид (pYP или pYV), обладают в 4,3–8,5 раза сниженной адгезивной активностью и в среднем в 2,0 раза меньше ингибируют поглотительную способность фагоцитов лабораторных животных, чем штаммы с полным набором плазмид. Общая перекись разрушающая активность чумного микроба характерна для бактерий штаммов с наличием pYP, а адгезивная активность – pYV.

2. Функциональная способность клеток иммунной системы в условиях как *in vitro*, так и *in vivo* в отношении бактерий *Y. pestis*, у которых отсутствует одна из плазмид (pYP, pYV) выражена в большей степени, чем *Y. pestis* с полным набором плазмид, что характеризуется повышением показателей НСТ-теста в среднем на 31,5 %, неферментных катионных белков на 72,7 % и активности миелопероксидазы на 38,5 %.

3. Выявлено снижение общего содержания Т-лимфоцитов и Т-хелперов (в среднем в 1,2 раза) в крови мышей, инфицированных *Y. pestis* с полным набором плазмид по сравнению со штаммами, у которых отсутствуют плазмиды (pYP, pYV). Функциональная активность Т-лимфоцитов и их субпопуляций в крови мышей, инфицированных *Y. pestis* с отсутствием одной из плазмид (pYP, pYV) повышается, достигает максимума к 7-м суткам эксперимента и составляет для Т-лимфоцитов – 71,4 %, цитотоксических Т-лимфоцитов – 16,4 %, а для Т-хелперов к 21-м суткам – 53,1 %.

4. Выявлены морфологические изменения в иммунокомпетентных органах (лимфатические узлы, селезенка), которые проявляются разной степенью активации иммунного ответа и выраженностью патологического процесса, зависящих от плазмидного состава *Y. pestis*. Увеличение площади Т-зависимых зон в иммунокомпетентных органах белых мышей, инфицированных *Y. pestis* с не полным набором плазмид (pYP⁻, pYV⁻) свидетельствует об активации клеточного звена иммунитета.

СПИСОК НАУЧНЫХ РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в научных журналах, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ

1. Изучение иммунофизиологических свойств штаммов чумного микроба с различным плазмидным составом / В. И. Дубровина, Г. Б. Мухтургин, С. В. Балахонов, С. А. Витязева [и др.] // Бюл. ВСНЦ СО РАМН. ISSN 1811-0649. – 2013. – № 6 (94). – С. 136–139.

2. Изменения клеточного состава перитонеальной жидкости белых мышей, вызванном *Yersinia pestis* с различным плазмидным составом / Т. П. Старовойтова, Т. А. Иванова, Г. Б. Мухтургин, С. А. Витязева [и др.] // Бюл. ВСНЦ СО РАМН. ISSN 1811-0649. – 2014. – № 5 (99). – С. 68–71.

3. Мухтургин, Г. Б. Клеточный состав перитонеальной жидкости белых мышей, инфицированных *Yersinia pestis* с разным плазмидным составом / Г. Б. Мухтургин, С. А. Витязева, В. В. Войткова // Инфекция и иммунитет. ISSN 2220-7619. – 2014. – Т. 4, № 1 – С. 80. (Scopus)

4. Особенности антиоксидантной активности чумного микроба разным плазмидным спектром / О. В. Юрьева, В. И. Дубровина, К. М. Корытов, Г. Б. Мухтургин [и др.] // Бюл. ВСНЦ СО РАМН. ISSN 1811-0649. – 2016. – Т. 1, № 5 (111). – С. 133–137.

5. Особенности иммуногенеза белых мышей, инфицированных *Yersinia pestis* с разным плазмидным составом / С. В. Балахонов, С. А. Витязева, В. И. Дубровина, Т. П. Старовойтова, Г. Б. Мухтургин [и др.] // Бюл. экспериментальной биологии и медицины. ISSN 0365-9615. – 2016. – Т. 162, № 10. – С. 465–469.

6. Патоморфологические изменения печени белых мышей при экспериментальной чумной инфекции, вызванной *Yersinia pestis* с разным

плазмидным составом / В. И. Дубровина, Т. П. Старовойтова, С. А. Витязева, **Г. Б. Мухтургин** [и др.] // Acta Biomedica Scientifica. ISSN 2541-9420. – 2017. – Т. 2, № 2 (114). – С. 69–73.

7. Immunogenesis in white mice infected with *Yersinia pestis* with different plasmid composition / S. V. Balakhonov, S. A. Vityazeva, V. I. Dubrovina, T. P. Starovoitova, **G. B. Mukhturgin** [et al.] // Bulletin of Experimental Biology and Medicine. – 2017. – Vol. 162, № 4. – P. 470–473. (Web of Science, Scopus)

Публикации в иных изданиях

8. Активность глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы чумного микроба *Yersinia pestis* с разным плазмидным профилем и взаимодействующих с ним перитонеальных макрофагов морских свинок / Ж. А. Коновалова, **Г. Б. Мухтургин**, В. И. Дубровина, Т. А. Иванова [и др.] // Известия Иркутского государственного университета. Серия: Биология. Экология. ISSN 2073-3372. – 2011. – Т. 4, № 4. – С. 53–57.

9. Сравнительная оценка свойств штаммов чумного микроба с разным плазмидным составом / С. А. Витязева, Ж. А. Коновалова, В. И. Дубровина, Т. А. Иванова, Т. П. Старовойтова, **Г. Б. Мухтургин** [и др.] // Материалы V Ежегодного Всероссийского конгресса по инфекционным болезням. Электронный сборник. – 2013. – С. 90.

10. Influence of *Yersinia pestis* plasmid content on its adhesive properties and phagocytic activity of peritoneal macrophages *in vitro* / V. I. Dubrovina, S. V. Balakhonov, Zh. A. Konovalova, S. A. Vityazeva, T. P. Starovoitova, T. A. Ivanova, **G. B. Mukhturgin** [et al.] // The International Conference «One world – One Health: Emerging and Re-Emerging Infectious Diseases Preparedness and Response» ISBN 978-99973-817-0-5. – Moscow, 2013. – P. 66–71.

11. Патоморфологические изменения в респираторном отделе легких белых мышей при экспериментальной чуме / С. А. Витязева, Т. П. Старовойтова, **Г. Б. Мухтургин**, В. И. Дубровина [и др.] // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. ISSN 2073-3046. – 2015. – Т. 14, № 5 (84) – С. 67–71.

12. Сравнительная оценка протеолитической и супероксиддисмутазной активности *Yersinia pestis* с разным плазмидным составом / О. В. Юрьева, В. И. Дубровина, **Г. Б. Мухтургин**, Т. А. Иванова [и др.] // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. ISSN 2073-3046. – 2015. – Т. 14, № 1 (80) – С. 83–87.

13. Иммунофенотипирование субпопуляционного состава клеток крови экспериментальных животных, инфицированных *Y. pestis* с разным плазмидным составом / В. В. Войткова, В. И. Дубровина, К. М. Корытов, **Г. Б. Мухтургин** [и др.] // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. ISSN 2073-3046. – 2016. – № 4 (89) – С. 87–93.

14. Оценка клеточного звена иммунитета белых мышей, инфицированных штаммами *Yersinia pestis*, выделенными на территории Горно-Алтайского природного очага чумы / В. В. Войткова, К. М. Корытов, **Г. Б. Мухтургин**, С. А. Витязева // Современные проблемы эпидемиологии и гигиены: Матер. VIII Всерос. науч.-практ. конф. молодых ученых и специалистов Роспотребнадзора. – 2016. – С. 103–104.

15. **Мухтургин, Г. Б.** Исследование состояния клеток иммунной системы морской свинки при взаимодействии с *Yersinia pestis* исходных и дефектных по плазмидному составу штаммов / **Г. Б. Мухтургин**, Ж. А. Коновалова // Современные проблемы эпидемиологии, микробиологии и гигиены: Матер. XI Всерос. науч.-практ. конф. молодых ученых и специалистов Роспотребнадзора (Уфа, 2–4 октября 2019 г.). – Уфа: Башк. энцикл., 2019. – С. 269–271.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

Г-6-ФДГ	– глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа
ЗФР	– забуференный 0,9% раствор хлорида натрия (рН 7,2)
ИДТК	– индекс дегрануляции тучных клеток
ИКК	– иммунокомпетентные клетки
ИЛ-1 α , ИЛ-2	– интерлейкины
ИС	– индекс стимуляции
Ис	– индекс содержания
КА	– коэффициент адгезии
КЗМ	– кислородзависимый метаболизм
м. м.	– молекулярная масса
МПО	– миелопероксидаза
НАДФ	– никотинамидениндинуклеотид фосфат окисленный
НАДФ·Н	– никотинамидениндинуклеотид фосфат восстановленный
НК	– нанокомпозит
НКБ	– неферментные катионные белки
НСТ	– нитросиний тетразолий
ОПРА	– общая перекись-разрушающая активность
ПК	– плазматические клетки
ПМ	– перитонеальные макрофаги
ПЯЛ	– полиморфноядерные лейкоциты
СОД	– супероксиддисмутаза
ТК	– тучные клетки
ФИП	– фагоцитарный индекс поглощения
ФНО- α	– фактор некроза опухоли- α
CD	– кластер дифференциации
LD ₅₀	– доза испытуемого агента, вызывающая гибель 50 % взятых в опыт животных
pTR33	– дополнительная плаزمида в геноме чумного микроба
pYP	– плазмида пистициногенности (pPst)
pYT	– плазмида токсигенности (pFra)
pYV	– плазмида кальцийзависимости (pCad)

Подписано в печать 05.02.2020. Бумага офсетная. Формат 60×84¹/₁₆.

Гарнитура Таймс. Усл. печ. л. 1,0

Тираж 100 экз. Заказ № 003-20.

РИО ИНЦХТ

(Иркутск, ул. Борцов Революции, 1. Тел. 29-03-37. E-mail: arleon58@gmail.com)