



УДК 616.981.452:612-015

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,
С. А. Белькова, С. В. Балахонов

ФКУЗ Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора, Иркутск
E-mail: adm@chumin.irkutsk.ru

Аннотация. Определена активность глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (Г6ФДГ) чумного микроба алтайского и основного подвидов с разным плазмидным составом и вирулентностью. Установлено, что все использованные в эксперименте штаммы *Yersinia pestis* проявляли Г6ФДГ активность, тем не менее, у вирулентного штамма чумного микроба содержащего плазмиды pPst, pCad, pTP33, pFra показатели были ниже по сравнению с *Y. pestis*, дефектными по плазмидному профилю. Проведены исследования активности Г6ФДГ перитонеальных макрофагов морских свинок при контакте с чумным микробом с разным плазмидным составом в условиях *in vitro*. Установлено, что активность Г6ФДГ перитонеальных макрофагов при фагоцитозе чумного микроба зависит от его плазмидного спектра, фенотипическое проявление которого выражается вирулентностью для лабораторных животных.

Ключевые слова: возбудитель чумы, глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа, фагоцит.

Введение

Известно, что возбудитель чумы, циркулирующий на территории природных очагов Сибири, отличается по плазмидному составу, питательным потребностям, ферментативной активности и вирулентности для различных видов диких и лабораторных животных [1; 7]. Так, имеются сведения о различиях биохимических свойствах штаммов алтайского и основного подвидов чумного микроба *Yersinia pestis* [6]. Для их дифференциации рядом исследователей предложен тест определения глюкозо-6-фосфатдегидрогеназной (Г6ФДГ) активности чумного микроба [8]. Однако активность этого фермента изучена не у всех штаммов *Y. pestis*, выделенных на территории сибирских природных очагов чумы.

В связи с тем что при взаимодействии фагоцита с микробом происходит повышение окисления глюкозы через гексозомонофосфатный шунт и значительное увеличение метаболической активности клеток, сопоставление реакции макрофагов на *Y. pestis*, имеющего разный набор плазмид, в частности на активность Г6ФДГ, вызывает несомненный интерес [2; 4; 5].

Цель исследования – определить уровень Г6ФДГ-активности *Y. pestis* и перитонеальных

макрофагов морских свинок при фагоцитозе чумного микроба разного плазмидного состава в условиях *in vitro*.

Материал и методы

В работе использовали штаммы чумного микроба, хранящиеся в коллекции музея живых культур ИркутскНИПЧИ Сибири и ДВ: *Y. pestis* ssp. *pestis* И–2638 (выделен в Тувинском природном очаге чумы); *Y. pestis* ssp. *pestis* И–3479 (И–2638 pCad-, выделен трёхкратным пассированием на среде VM [1]); *Y. pestis* ssp. *pestis* И–2638 pPst-pCad- (И–3480, выделен XIV пассажем на среде Луриа-Бертани при температуре 4–5 °С [1]); *Y. pestis* ssp. *altaica* И–2359 и *Y. pestis* ssp. *altaica* И–2996 (выделены в Горно-Алтайском природном очаге чумы) (табл.).

Эксперименты выполнены на 10 сертифицированных (НПО «Вектор», г. Новосибирск) стандартных по условиям содержания и кормления морских свинок весом 200–250 г. Активность Г6ФДГ определяли в перитонеальных макрофагах ($2 \cdot 10^7$ кл./мл) экспериментальных животных (контроль), в клетках чумного микроба ($5 \cdot 10^9$ кл./мл), а также при взаимодействии *Y. pestis* с макрофагами (50:1) в условиях *in vitro* [3].

Характеристика вирулентности и плазмидного состава штаммов чумного микроба *Y. pestis*, использованных в экспериментах

№ п/п	Штамм	Вирулентность (м. к.)		Плазмидный состав
		б/м	м/св	
1	<i>Y. pestis</i> ssp. <i>altaica</i> И-2359	LD ₅₀ =41780	авирулентен	pPst+pCad+pFra+
2	<i>Y. pestis</i> ssp. <i>altaica</i> И-2996	LD ₅₀ =4014	авирулентен	pPst-pCad+pFra+
3	<i>Y. pestis</i> ssp. <i>pestis</i> И-2638	DCL 10 ²	DCL 10 ²	pPst+pCad+pTP33+pFra+
4	<i>Y. pestis</i> ssp. <i>pestis</i> И-3480	авирулентен в дозе 10 ⁷	авирулентен в дозе 10 ⁹	pPst-pCad-pTP33+pFra+
5	<i>Y. pestis</i> ssp. <i>pestis</i> И-3479	авирулентен в дозе 10 ⁷	авирулентен в дозе 10 ⁹	pPst+pCad-pTP33+pFra+

Для получения фагоцитарно-микробной взвеси к 20 млн фагоцитов (в 1 мл среды 199) добавляли 0,2 мл $5 \cdot 10^9$ взвеси бактерий. Фагоциты инкубировали с чумным микробом в течение 60 мин при 37 °С. Активность Г6ФДГ в фагоцитирующих перитонеальных макрофагах оценивали по формуле:

$$\Delta \text{ЕОП} = \text{ЕОП}_{(\text{мф}+\text{Y.p.})} - \text{ЕОП}_{(\text{Y.p.})},$$

где ЕОП – условные единицы оптической плотности; мф+ Y.p. – макрофагально-микробная взвесь; Y.p. – *Y. pestis*. Эксперименты проведены в трёх повторностях. Животных выводили из эксперимента в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных» (приказ МЗ СССР № 755 от 12.08.77). Статистический анализ полученных результатов осуществляли стандартными методами и выражали в виде условных единиц оптической плотности как среднее (X) и стандартное отклонение (s). Для сравнения средних из выборок использовали U-критерий Манна – Уитни. Различия считали

достоверными при $P < 0,05$. Статистический анализ данных проводили с помощью пакета стандартных программ STATISTICA 6.

Результаты

Г6ФДГ-активность *Y. pestis* с разным плазмидным спектром. Все исследованные штаммы чумного микроба в экспериментах экспрессируют биологическую активную Г6ФДГ (рис. 1).

При сравнении активности Г6ФДГ чумного микроба разных подвидов наименьшие уровни фермента зарегистрированы в клетках вирулентного штамма *Y. pestis* ssp. *pestis* И-2638 (pPst+pCad+pTP33+pFra+), которые были ниже в среднем в 2,1–2,4 раза по сравнению с другими ($P = 0,016704$). Для двух изогенных вариантов – *Y. pestis* ssp. *pestis* И-3479 и *Y. pestis* ssp. *pestis* И-3480 вирулентного штамма (*Y. pestis* ssp. *pestis* И-2638) и клеток *Y. pestis* ssp. *altaica* существенных различий Г6ФДГ активности не выявлено.

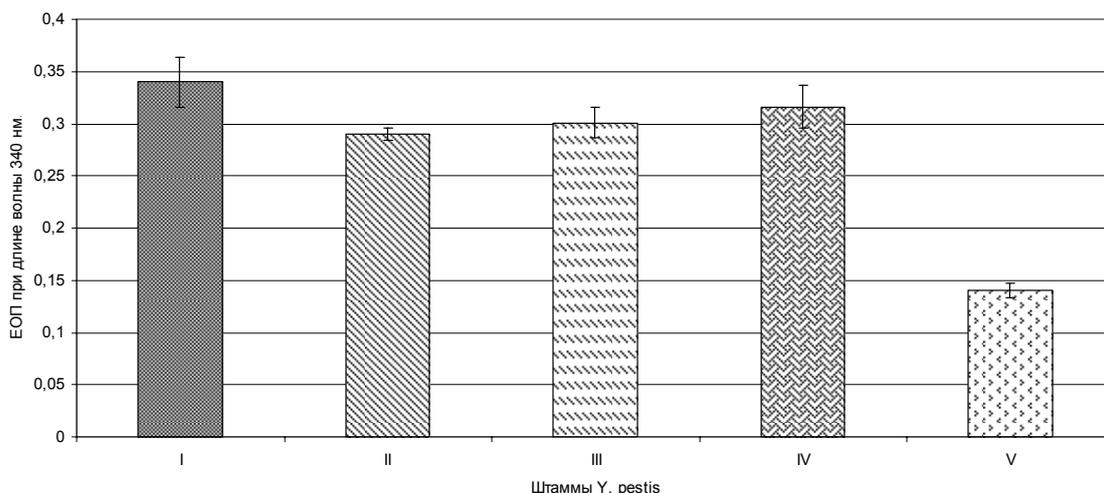


Рис. 1. Характеристика активности Г6ФДГ чумного микроба разных подвидов. I – *Y. pestis* ssp. *altaica* И-2996; II – *Y. pestis* ssp. *altaica* И-2359; III – *Y. pestis* ssp. *pestis* И-3479; IV – *Y. pestis* ssp. *pestis* И-3480; V – *Y. pestis* ssp. *pestis* И-2638

Активность Г6ФДГ у фагоцитов экспериментального животного при контакте с чумным микробом. Показано, что при контакте фагоцитов с *Y. pestis* ssp. *altaica* И-2996 (pPst-pCad+pFra+) и *Y. pestis* ssp. *pestis* И-3480 (pPst-pCad-pTP33+pFra+) происходит достоверное ($P = 0,016502$) повышение активности Г6ФДГ в фагоцитах по сравнению с интактными клетками в 1,3 раза. В случае *Y. pestis* ssp. *pestis* И-3479 (pPst+pCad-pTP33+pFra+) показатели Г6ФДГ фагоцитов незначительно отличались от контрольных. *Y. pestis* ssp. *pestis* И-2638 (pPst+pCad+pTP33+pFra+) в 1,6 раза ($P = 0,0495$) ингибировал активность Г6ФДГ фагоцитирующих макрофагов, по сравнению с контролем (рис. 2).

Таким образом, в ходе эксперимента получены данные, свидетельствующие о различиях тестируемых штаммов по активности одного из возможных маркеров вирулентности чумного микроба – фермента Г6ФДГ, что, вероятно, связано с особенностями плазмидного профиля клеток возбудителя. Так, у *Y. pestis* ssp. *pestis* И-2638 (pPst+pCad+pTP33+pFra+) отмечены наименьшие по сравнению с остальными тестируемыми штаммами показатели активности Г6ФДГ, что подтверждает данные других ис-

следователей о низкой способности экспрессировать активную форму этого фермента вирулентными штаммами из-за миссенс-мутаций (замена пролина на серин в аминокпозиции 155) [8].

Как известно, отличительными признаками некоторых тувинских штаммов чумного микроба является наличие в геноме дополнительной четвёртой плазмиды pTP33 с молекулярной массой 22 МД [1]. В настоящее время значение этой криптической плазмиды в определении биологических свойств чумного микроба до конца не выяснено. Высказано предположение, что плазида pTP33 является продуктом рекомбинационного контегративного взаимодействия плазмид pPst и pFra *Y. pestis* [1]. В связи с этим наличие в геноме тувинских штаммов плазмиды pTP33, на наш взгляд, может опосредованно влиять на ингибирование механизмов микробицидности фагоцитов, связанных с «респираторным взрывом», в частности Г6ФДГ.

Повышение активности этого фермента у фагоцитов при контакте с *Y. pestis* (pPst-), по сравнению с pPst+ вариантами, может указывать на участие этой плазмиды в экспрессии Г6ФДГ.

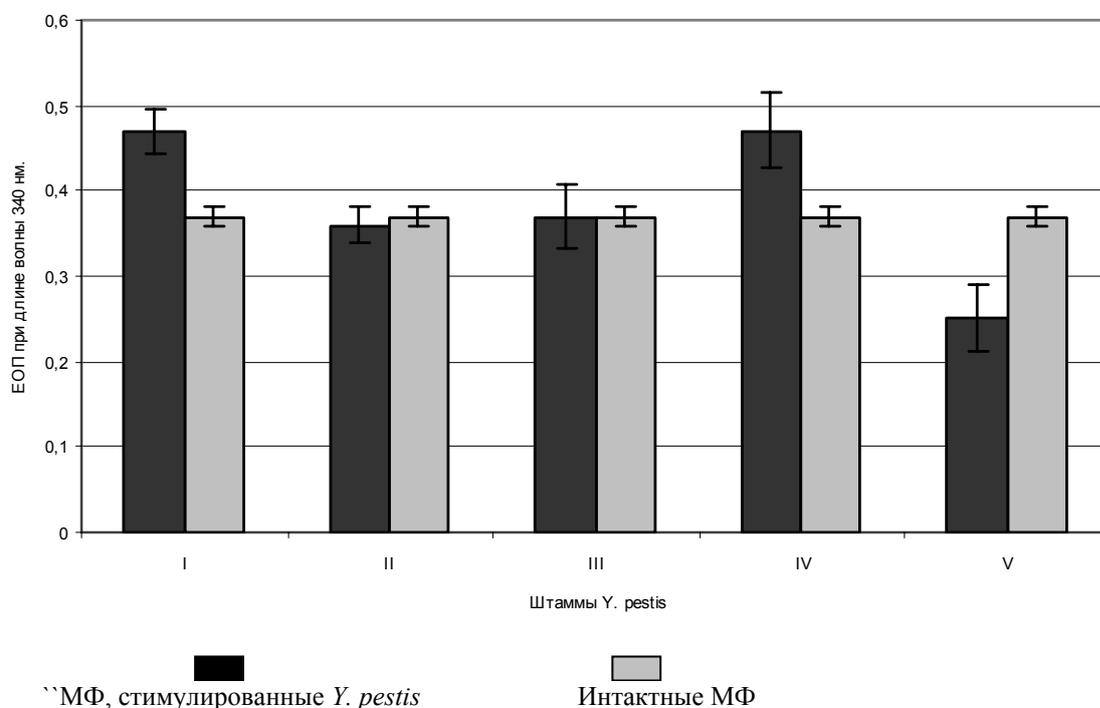


Рис. 2. Активность Г6ФДГ макрофагов (МФ) экспериментального животного при контакте с чумным микробом разных подвидов. I – *Y. pestis* ssp. *altaica* И-2996; II – *Y. pestis* ssp. *altaica* И-2359; III – *Y. pestis* ssp. *pestis* И-3479; IV – *Y. pestis* ssp. *pestis* И-3480; V – *Y. pestis* ssp. *pestis* И-2638

Анализ полученных данных свидетельствует о том, что в условиях *in vitro* высокие значения активности Г6ФДГ у фагоцитирующих бактерии изогенного штамма *Y. pestis* И–3480 макрофагов по сравнению с исходным *Y. pestis* И–2638 (pPst+pCad+pTP33+pFra+), что, возможно, связано с отсутствием у мутанта плазмид pCad и pPst.

Таким образом, характер взаимодействия «паразит – фагоцит» связан с наличием генных детерминант, обуславливающих экспрессию факторов, ингибирующих ферментативные процессы макрофагов.

Тем не менее, необходимы дальнейшие исследования определения активности Г6ФДГ чумного микроба как биохимическим методом, так и с применением молекулярно-генетических методов, в том числе у изогенных (Г6ФДГ[–]) вариантов.

Выводы

1. Все использованные в эксперименте штаммы *Y. pestis* проявляли активность Г6ФДГ.

2. Наименьшие значения Г6ФДГ активности зарегистрированы у вирулентного *Y. pestis* ssp. *pestis* И–2638 (pPst+pCad+pTP33+pFra+).

3. В перитонеальных макрофагах морских свинок при фагоцитозе *Y. pestis* ssp. *altaica* И–2996 (pPst-pCad+pFra+), *Y. pestis* ssp. *pestis* И–3480 (pPst-pCad-pTP33+pFra+) происходит активация Г6ФДГ в 1,3 раза ($P = 0,016502$) по сравнению с интактными макрофагами.

4. *Y. pestis* ssp. *pestis* И–2638 (pPst+pCad+pTP33+pFra+), являющийся виру-

лентным для морских свинок, ингибировал Г6ФДГ активность фагоцитарноактивных клеток.

Литература

1. Балахонов С. В. Геномные маркеры возбудителей чумы, псевдотуберкулёза, холеры, бруцеллёза : дис. ... д-ра мед. наук : 03.00.07 – микробиология; 14.00.07 – эпидемиология / С. В. Балахонов. – Саратов, 2000. – 263 с.
2. Голубинский Е. П. Дыхательный аппарат и окислительный метаболизм чумного микроба : дис. ... д-ра мед. наук : 03.00.04 – биол. биохимия / Е. П. Голубинский. – Саратов, 1973. – 417 с.
3. Голубинский Е. П. Активность бактерицидных систем фагоцитов у интактных и иммунизированных против туляремии морских свинок / Е. П. Голубинский, И. С. Бойкова, В. И. Дубровина // Журн. микробиологии. – 1995. – № 2. – С. 77–79.
4. Домарадский И. В. Чума: современное состояние, гипотезы, проблемы / И. В. Домарадский. – Саратов : Изд-во Саратов. мед. ин-та, 1993. – 130 с.
5. Иммунология : в 3 т. : пер. с англ. / под ред. У. Пола. – М. : Мир, 1989. – Т. 3. – 360 с.
6. Куклева Л. М. Сравнительная характеристика биохимических свойств штаммов разных подвидов *Yersinia pestis* и *Yersinia pseudotuberculosis* / Л. М. Куклева, И. А. Кузьмиченко, О. А. Проценко // Проблемы особо опасных инфекций. – 2001. – Вып. 81. – С. 105–110.
7. Современное состояние природных очагов чумы Сибири / С. В. Балахонов [и др.] // Журн. инфекц. патологии. – 2009. – Т. 16, № 3. – С. 16–20.
8. Attenuated enzootic (pestoides) isolates of *Yersinia pestis* express active aspartase / S. W. Bearden [et al.] // Microbiology. – 2009. – Vol. 155, Part 1. – P. 198–209.

Glucose-6-phosphate dehydrogenase activity of *Yersinia pestis* and phagocytes of guinea pigs in their contact with plague microbe of different plasmid compound

Zh. A. Konovalova, G. B. Muchturgin, V. I. Dubrovina, T. A. Ivanova, S. A. Bel'kova, S.V. Balakchonov

Irkutsk Antiplague Research Institute of Siberia and Far East of Rosпотребнадзор, Irkutsk

Abstract. The glucose-6-phosphate dehydrogenase (Zwf) activity in *Yersinia pestis* subsp. *pestis* и *Yersinia pestis* subsp. *altaica* with different plasmid spectrum was evaluated. Different levels of Zwf activity was observed in all strains of *Y. pestis* that were taken to experiment. Virulent *Yersinia pestis* subsp. *pestis* possess minimal index Zwf activity. The dynamics of Zwf activity in peritoneal macrophages of guinea pigs in contact with *Yersinia pestis* subsp. *pestis* и *Yersinia pestis* subsp. *altaica* was investigated *in vitro*. Increasing activity of Zwf at peritoneal macrophages are phagocytising plague agent was depending of plasmid compound of *Yersinia pestis*.

Keywords: Plague agent, glucose-6-phosphate dehydrogenase, phagocytes

Коновалова Жанна Анатольевна
ФКУЗ Иркутский научно-исследовательский
противочумный институт Роспотребнадзора

Konovalova Zhanna Anatolyevna
FKUZ Irkutsk Antiplague Research Institute
of Rosпотребнадзор

664047, Иркутск, Трилиссера, 78
кандидат биологических наук,
старший научный сотрудник
тел. (3952)22-13-12

Мухтургин Геннадий Борисович
ФКУЗ Иркутский научно-исследовательский
противочумный институт Роспотребнадзора
664047, Иркутск, Трилиссера, 78
младший научный сотрудник
тел. (3952)22-13-12
E-mail: adm@chumin.irkutsk.ru

Дубровина Валентина Ивановна
ФКУЗ Иркутский научно-исследовательский
противочумный институт Роспотребнадзора
664047, Иркутск, Трилиссера, 78
доктор биологических наук, заведующий
лабораторией патофизиологии
тел. (3952)22-13-12
E-mail: adm@chumin.irkutsk.ru

Иванова Татьяна Александровна
ФКУЗ Иркутский научно-исследовательский
противочумный институт Роспотребнадзора
664047, Иркутск, Трилиссера, 78
заведующий лабораторией экспериментальных
животных
тел. (3952)22-13-12
E-mail: adm@chumin.irkutsk.ru

Белькова Светлана Анатольевна
ФКУЗ Иркутский научно-исследовательский проти-
вочумный институт Роспотребнадзора
664047, Иркутск, Трилиссера, 78
кандидат биологических наук,
старший научный сотрудник
тел. (3952)22-13-12
E-mail: adm@chumin.irkutsk.ru

Балахонов Сергей Владимирович
ФКУЗ Иркутский научно-исследовательский
противочумный институт Роспотребнадзора
664047, Иркутск, Трилиссера, 78
доктор медицинских наук профессор,
директор института
тел. (3952)22-13-12
E-mail: adm@chumin.irkutsk.ru

78 Trilissera St, Irkutsk, 664047
Ph.D. in Biology, senior research scientist
phone: (3952)22-13-12

Muchturgin Gennagiy Borisovich
FKUZ Irkutsk Antiplague Research Institute
of Rospotrebnadzor
78 Trilissera St, Irkutsk, 664047
junior research scientist
phone: (3952)22-13-12
E-mail: adm@chumin.irkutsk.ru

Dubrovina Valentina Ivanovna
FKUZ Irkutsk Antiplague Research Institute
of Rospotrebnadzor
78 Trilissera St, Irkutsk, 664047
D. Sc. in Biology, Head of laboratory
phone: (3952)22-13-12
E-mail: adm@chumin.irkutsk.ru

Ivanova Tatyana Aleksandrovna
FKUZ Irkutsk Antiplague Research Institute
of Rospotrebnadzor
78 Trilissera St, Irkutsk, 664047
Head of laboratory
phone: (3952)22-13-12
E-mail: adm@chumin.irkutsk.ru

Bel'kova Svetlana Anatolyevna
FKUZ Irkutsk Antiplague Research Institute
of Rospotrebnadzor
78 Trilissera St, Irkutsk, 664047
Ph.D. in Biology, senior research scientist
phone: (3952)22-13-12
E-mail: adm@chumin.irkutsk.ru

Balahonov Sergeiy Vladimirovich
FKUZ Irkutsk Antiplague Research Institute
of Rospotrebnadzor
78 Trilissera St, Irkutsk, 664047
D. Sc. in Medicine, Prof., Director of institute
phone: (3952)22-13-12
E-mail: adm@chumin.irkutsk.ru