

В.И.Дубровина, С.А.Татарников, Ж.А.Коновалова, В.В.Войткова, А.В.Мазепа, С.В.Лукьянова,
В.Н.Рычкова, А.И.Бельков, Т.Т.Шкаруба

ВЛИЯНИЕ ТУЛЯРЕМИЙНОГО МИКРОБА РАЗНЫХ ПОДВИДОВ НА ФУНКЦИОНАЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ ИММУНОКОМПЕТЕНТНЫХ КЛЕТОК ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ЖИВОТНЫХ

ФГУЗ «Научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока», Иркутск

На основании проведенных исследований молекулярно-биологических механизмов пато-, иммуно- и морфогенеза показана роль бактерицидных механизмов (кислород-, нитроксидзависимых и кислороднезависимых) фагоцитоза туляремиального микроба клетками иммунофагоцитарной системы. С применением праймеров *pdpD*-1F, *pdpD*-1R, *pdpA*1, *pdpA*2 в ПЦР показано, что структура островков патогенности FPI штаммов *F. tularensis* разных подвидов, зависит от подвидовой принадлежности и, вероятно, связана с вирулентностью туляремиального микроба. При оценке реакции макроорганизма на внедрение туляремиального микроба разных подвидов получены данные, имеющие прогностическое значение для характеристики течения инфекционного процесса и для разработки критериев ответной реакции со стороны лимфоидных органов в патологическом и адаптивном процессах.

Ключевые слова: *Francisella tularensis*, макрофаги, полиморфноядерные лейкоциты, лимфоциты, цитокины, бактерицидные системы фагоцитов, иммунокомпетентные органы.

В настоящее время большое внимание уделяется заболеванию, вызванному бактерией *Francisella tularensis*, из-за возможности его применения в террористических актах. В связи с увеличившимся интересом к этой инфекции стали проявляться многие, ранее не понятные, факты. Однако отдельные вопросы еще остаются не изученными. К приоритетным направлениям исследований относится раскрытие механизмов функционирования иммунофагоцитарной системы, обеспечивающей устойчивость организма к воздействию инфекционных патогенов. Способность многих патогенных бактерий к паразитированию в фагоцитах, в том числе и туляремиального микроба, играет важную роль в патогенезе инфекции. В связи с этим сопоставление свойств *F. tularensis* разных подвидов и вирулентности в аналогичных условиях взаимодействия позволит внести некоторую ясность в понимание закономерностей взаимоотношений «хозяин-паразит».

Цель исследования – выяснение особенностей бактерицидных механизмов фагоцитоза клеток иммунофагоцитарной системы и морфофункциональных изменений в иммунокомпетентных органах экспериментальных животных в динамике инфекционного процесса, вызванного *F. tularensis* разных подвидов.

Проведено изучение патогенеза и иммуногенеза туляремии, отдельных структурных элементов генетического аппарата, особенностей влияния *F. tularensis* разных подвидов на бактерицидные функции клеток иммунофагоцитарной системы и на макроорганизм с точки зрения патоморфологических, патогистологических и восстановительно-компенсаторных изменений в иммунокомпетентных органах.

Материалы и методы

Опыты *in vivo* проводили с использованием 415 беспородных морских свинок (массой 300–350 г) и 230 белых мышей (18–20 г). Для воссоздания экс-

периментального инфекционного процесса морским свинкам вводили подкожно туляремиальный микроб в дозе 100 КОЕ, белым мышам – 1 КОЕ. Животных выводили из эксперимента воздушной эмболией сосудов сердца в соответствии с Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных (2003 г.).

В качестве объекта исследования использовали 10 штаммов возбудителя туляремии – вакцинный *F. tularensis* 15 НИИЭГ (*F. tularensis* subsp. *holarctica*); *F. tularensis* subsp. *tularensis* И-163 (Schu); *F. tularensis* subsp. *holarctica* И-94 (401), И-250 (306), И-335 (4), И-366 (1049); *F. tularensis* subsp. *mediaasiatica* И-357 (А-120), И-385 (А-61); *F. tularensis* subsp. *novicida* И-383 (F 6168), И-384 (Utah 112).

Вирулентность и подвидовые различия штаммов определяли на лабораторных животных (белых мышках и морских свинках) по биохимическим свойствам и различию в строении геномных областей *pdpD* и *pdpA* острова патогенности (FPI) по методу F.E.Nano [6]. Фрагмент *pdpD* (720 п.н.) у всех штаммов амплифицировали методом ПЦР с праймерами: *pdpD*-1F, 5'-TGC TTT TAG TGG GTC ATG GA-3', и *pdpD*-1R, 5'-CTA CGG CAT AAA TGG CTG GT-3'; фрагмент *pdpA* (307 п.н.) – с праймерами *pdpA*1, 5'-CAA GTG CTT GTT GGT GGT AA-3' и *pdpA*2, 5'-TGA TGT TTG ACC TGA ATT AGT GG-3'. Олигонуклеотиды производства ЗАО «Синтол» (Москва).

Активность NO-синтазы (NOS) определяли по методу L.C.Green [5] в нашей модификации [1] и выражали в мкМ/10⁶ фагоцитов.

В качестве продуцента цитокинов использовали перитонеальные макрофаги белых мышей. Индуктором цитокинов (ИЛ-1α, ФНО-α, ИФН-γ, ИЛ-10) служили туляремиальные микробы разных подвидов. Влияние туляремиального микроба на цитокин-продуцирующую активность изучали в ИФА с помощью моноклональных антител (Bender MedSystems GmbH, Вена, Австрия). Для гистологических ис-

следований забирали регионарные лимфатические узлы и селезенку. Использовали методы обзорной микроскопии с окраской гематоксилином-эозином, метиловым зеленым-пиронином [3]. Забор материала на исследование производили на 3, 6, 9 и 18-е сутки. Контролем служили перитонеальные макрофаги и регионарные лимфатические узлы, селезенка интактных животных.

Все полученные материалы обработаны статистически стандартными параметрическими методами с использованием t-критерия Стьюдента и с применением стандартного пакета программ «Statistica», версия 6 (Copyright©Stat Soft, Inc 19842001, ИПЧИ 31415926535897) и программы Microsoft Excel (2003 г.) корпорации Microsoft. Достоверными оценивали различия при уровне значимости $p < 0,05$, $p < 0,01$.

Результаты и обсуждение

Ранее при изучении влияния *F. tularensis* разных подвидов на иммунокомпетентные клетки экспериментальных животных в условиях *in vitro* нами было показано, что туляремиальный микроб подвидов *tularensis* и *mediaasiatica* снижает фагоцитарную способность фагоцитов, что, в свою очередь, приводит к незавершенности фагоцитоза [2]. Подтверждением тому является снижение функциональной активности нейтрофилов и макрофагов при взаимодействии с туляремиальным микробом подвидов *tularensis* и *mediaasiatica* в большей мере, чем с представителями других исследованных подвидов *F. tularensis*. Низкие показатели содержания катионного белка и угнетение активности NOS, возможно, связаны с потерей активности фермента и катионного белка в процессе фагоцитоза туляремиального микроба.

Данные, полученные при использовании праймеров для амплификации внутренних фрагментов «острова патогенности» *pdpA*, *pdpD* в ПЦР, демон-

стрируют сходную структуру FPI в штаммах *F. tularensis* подвида *tularensis* и *novicida*. Ген, кодирующий белок *pdpD*, отсутствует в штаммах *F. tularensis* подвида *holarctica*, в том числе и в *F. tularensis* 15 НИИЭГ. Установлено, что ген, кодирующий белок *pdpA*, присутствует во всех исследованных штаммах, кроме *F. tularensis* subsp. *mediaasiatica* И-385. Возможно, это связано с утратой вирулентности в процессе хранения штамма. Результаты амплификации представлены на рис. 1.

Установлено, что при инфицировании морских свинок туляремиальным микробом разных подвидов так же, как и *in vitro*, в фагоцитах происходит стимуляция продукции NO (рис. 2). В наибольшей степени образование монооксида азота, характеризующее активацию NOS, имело место при взаимодействии туляремиального микроба подвида *novicida* (И-384). Снижение активности NOS фагоцитов, выявленное у морских свинок, инфицированных *F. tularensis* subsp. *tularensis*, возможно, объясняется тем, что у туляремиальных бактерий этого подвида обнаружен ген, продукты которого являются антагонистами монооксида азота и могут противодействовать антимикробной активности фагоцита при внутриклеточной инфекции [4].

Показано, что фагоциты животных, инфицированных франциселлами разных подвидов, по сравнению с контролем, продуцируют как провоспалительные, так и противовоспалительные цитокины на 3, 6, 9-е сутки наблюдения ($P < 0,05$). Максимальные уровни провоспалительных цитокинов: ИЛ-1 α и ИФН- γ зарегистрированы на 6-е, а ФНО- α на 3-и сутки наблюдения. В макрофагах белых мышей, зараженных *F. tularensis*, всех исследованных подвидов продукция ФНО- α зарегистрирована на 3, 6 и 9-е сутки наблюдения, а в случае *F. tularensis* subsp. *mediaasiatica* И-385 также и на 18-е сутки (рис. 3).

Туляремиальный микроб неарктического подвида оказывал наиболее выраженный стимулирующий эффект на продукцию этих цитокинов. Наименьшие показатели цитокинпродуцирующей активности фа-

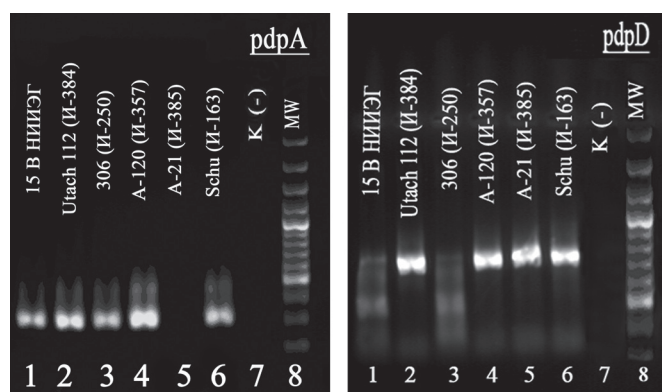


Рис. 1. Результаты амплификации генов *pdpA* и *pdpD* с помощью ПЦР в структуре острова патогенности штаммов *F. tularensis* разных подвидов:

1 – Вакцинный аттенуированный штамм *F. tularensis* subsp. *holarctica* 15 НИИЭГ; 2 – *F. tularensis* subsp. *novicida* И-384 (Utah-112); 3 – *F. tularensis* subsp. *holarctica* И-250 (306); 4 – *F. tularensis* subsp. *mediaasiatica* И-357 (A-120); 5 – *F. tularensis* subsp. *mediaasiatica* И-385 (A-61); 6 – *F. tularensis* subsp. *tularensis* И-163 (Schu); 7 – отрицательный контроль; 8 – маркер молекулярного веса 100 bp («Fermentas», Латвия)

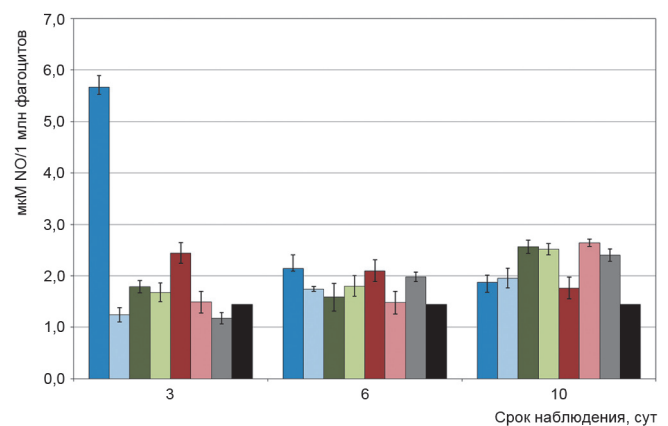


Рис. 2. Активность NOS перитонеальных макрофагов в динамике инфекционного процесса, вызванного туляремиальным микробом разных подвидов ($M \pm m$)

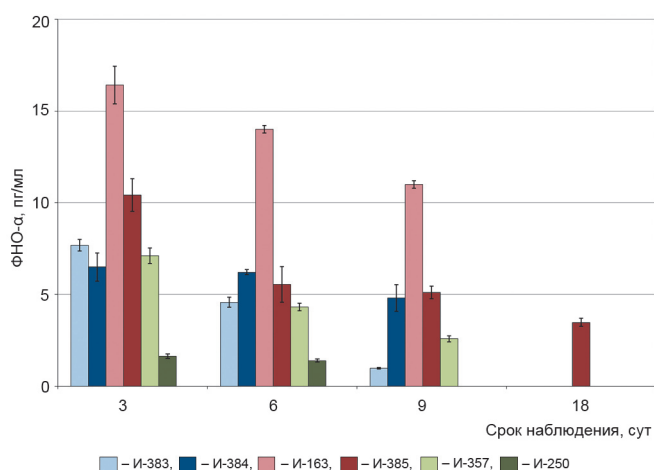


Рис. 3. Показатели продукции ФНО- α фагоцитами мышей, зараженных *F. tularensis* разных подвидов ($M \pm m$)

гоцитов зарегистрированы в группе животных, зараженных туляремийным микробом голарктического и среднеазиатского подвидов.

Установлено, что достоверное ($P < 0,05$) увеличение продукции ИЛ-10 фагоцитами животных, зараженных *F. tularensis*, разных подвидов происходит на 6-е сутки, при этом уровень этого цитокина в образцах, полученных от белых мышей, инфицированных *F. tularensis*, подвидов *novicida* и *mediaasiatica* И-357 был в 1,6–2,3 раза выше, по сравнению с другими группами животных ($P < 0,05$).

Таким образом, с помощью предложенных F.E.Nano [6] праймеров pdpD-1F, pdpD-1R, pdpA1, pdpA2 удалось охарактеризовать структуру FPI в двухпраймерной ПЦР штаммов *F. tularensis* разных подвидов и установить межподвидовые различия. Показана взаимосвязь генетической структуры острова патогенности туляремийного микроба с вирулентностью и его подвидовой принадлежностью.

Показано, что выявленные различия в функционировании механизмов неспецифической защиты макроорганизма (активность NOS фагоцитов и продукция цитокинов), а также иммунная перестройка организма (реакция клеток иммунокомпетентных органов) в ответ на внедрение патогена зависят от подвидовой принадлежности туляремийного микроба. Полученные нами данные могут способствовать пониманию механизма патогенеза туляремийной инфекции на молекулярном уровне, выявлению дефектов в функционировании механизмов защиты макроорганизма и поиску способов коррекции этих нарушений.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Дубровина В.И., Коновалова Ж.А., Колесникова О.Б., Татарников С.А., Витязева С.А., Войткова В.В. и др. Определение функционального состояния фагоцитов в качестве показателя неспецифической защиты организма (методические рекомендации). Иркутск; 2008. 9 с.
2. Дубровина В.И., Татарников С.А., Коновалова Ж.А., Мазепа А.В., Витязева С.А., Бельков А.И. и др. Функционально-метаболическая активность фагоцитов при взаимодействии с туляремийным микробом разных подвидов. Мед. паразитол. и паразитарн. бол. 2008; 2:17–21.
3. Лили Р. Патологическая техника и практическая гистология. М.: Мир; 1969. 645 с.
4. Broekhuijsen M., Larsson P., Johansson A., Bystrom M., Eriksson U., Larsson E. et al. Genome-wide DNA microarray analysis of *Francisella tularensis* strains demonstrates extensive genetic conservation within the highly virulent *F. tularensis* subsp. *tularensis*. J. Clin. Microbiol. 2003; 41(7):2924–31.
5. Green L.C., Wagner D.A., Glogowski J., Skipper P.L., Wishnok J.S., Tannenbaum S.R. Analysis of nitrate, nitrite and [^{15}N] in biological fluids. Anal. Bioch. 1982; 126(1):131–8.
6. Nano F.E., Zhang N., Cowley S.C., Klose K.E., Cheung K.M., Roberts M.J. et al. A *Francisella tularensis* pathogenicity island required for intramacrophage growth. J. Bacteriol. 2004; 186(19):6430–36.

V.I.Dubrovina, S.A.Tatarnikov, Zh.A.Konvalova, V.V.Voitkova, A.V.Mazepa, S.V.Lukiyanova, V.N.Rychkova, A.I.Belkov, T.T.Shkaruba

Influence of Tularemia Microbe of Different Subspecies on the Functional Activity of Immunocompetent Cells of Experimental Animals

Anti-Plague Research Institute of Siberia and Far East, Irkutsk

Analysis of molecular-biological mechanisms of patho-, immuno- and morphogenesis allowed to determine the role of bactericidal mechanisms (oxygen-, nitroxide-related and oxygen-free) of tularemia microbe phagocytosis by immunophagocytic system cells. Using PCR with primers pdpD-1F, pdpD-1R, pdpA1, pdpA2 it was shown that the structure of pathogenicity islands (FPI) in *F. tularensis* strains of different subspecies depended upon what subspecies the strain belonged to, and was probably associated with tularemia microbe virulence. The macroorganism reaction to the introduction of tularemia microbe of different subspecies was evaluated. The obtained data were of prognostic significance for characterization of infectious process course and for the development of criteria for lymphoid organs response in pathologic and adaptive processes.

Key words: *Francisella tularensis*, macrophages, polymorphonuclear leukocytes, lymphocytes, cytokines, bacterial systems of phagocytes, immunocompetent organs.

Об авторах:

Дубровина В.И., Татарников С.А., Коновалова Ж.А., Войткова В.В., Мазепа А.В., Лукьянова С.В., Рычкова В.Н., Бельков А.И., Шкаруба Т.Т. Научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока. 664047, Иркутск, Трилисера, 78. E-mail: adm@chumin.irkutsk.ru

Authors:

Dubrovina V.I., Tatarnikov S.A., Konvalova Zh.A., Voitkova V.V., Mazepa A.V., Lukiyanova S.V., Rychkova V.N., Belkov A.I., Shkaruba T.T. Irkutsk Research Anti-Plague Institute of Siberia and Far East. 664047, Irkutsk, Trilissera St., 78. E-mail: adm@chumin.irkutsk.ru

Поступила 15.03.10.