

УДК 616-092. 9:579.852.11:612.017.11

ВЛИЯНИЕ *BACILLUS ANTHRACIS* С РАЗНЫМ ПЛАЗМИДНЫМ СОСТАВОМ НА ПАТОЛОГИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ И НАКОПЛЕНИЕ ЦИКЛИЧЕСКИХ НУКЛЕОТИДОВ В ТИМУСЕ И СЕЛЕЗЕНКЕ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ЖИВОТНЫХ

В.И. Дубровина, О.В. Юрьева, А.Б. Пятидесятникова, Т.П. Старовойтова, О.Б. Колесникова, Е.В. Кравец, Т.А. Иванова, С.В. Балахонов
ФКУЗ Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора, Иркутск, РФ

*Изучены соотношение циклического аденозинмонофосфата/циклического гуанозинмонофосфата и патологические изменения в иммунокомпетентных органах (тимус, селезенка) белых мышей, инфицированных *Bacillus anthracis* с разным плазмидным составом. Выявлены различия действия *B. anthracis* на функциональное состояние клеток иммунной системы (дифференцировка и пролиферация клеток), которые зависят от плазмидного состава сибиреязвенного микроба. Установлено наличие морфологических изменений иммунокомпетентных органов лабораторных животных при экспериментальной сибиреязвенной инфекции, проявляющиеся разной степенью выраженности патологического процесса и активации иммунного ответа, обусловленные плазмидой pXO1⁺.*

Ключевые слова: *Bacillus anthracis*; экзотоксин; цАМФ; цГМФ; иммунитет

INFLUENCE OF *BACILLUS ANTHRACIS* WITH DIFFERENT PLASMID COMPOSITION ON PATHOLOGICAL CHANGES AND ACCUMULATION OF CYCLIC NUCLEOTIDES IN THYMUS AND SPLEEN OF EXPERIMENTAL ANIMALS

V.I. Dubrovina, O.V. Yurieva, A.B. Pentecostnikova, T.P. Starovoitova, O.B. Kolesnikova, E.V. Kravets, T.A. Ivanova, S.V. Balakhonov
Irkutsk Antiplague Research Institute of Siberia and Far East of Rospotrebnadzor, Irkutsk, Russian Federation

*The ratio of cyclic adenosine monophosphate / cyclic guanosine monophosphate and pathological changes in immunocompetent organs (thymus, spleen) of white mice infected with *Bacillus anthracis* with different plasmid composition were studied. Differences in the action of *B. anthracis* on the functional state of cells of the immune system (differentiation and proliferation of cells), which depend on the plasmid composition of the sibil ulcer microbe, were revealed. The presence of morphological changes in the immunocompetent organs of laboratory animals during experimental anthrax infection, manifested by varying degrees of severity of the pathological process and activation of the immune response, caused by the pXO1⁺ plasmid, was established.*

Key words: *Bacillus anthracis*; exotoxin; cAMP; cGMP; immunity

В пато- и иммуногенезе сибиреязвенной инфекции ключевую роль играет секретируемый возбудителем экзотоксин, детерминанты которого локализованы на плазмиде pXO1. В состав экзотоксина входят протективный антиген (ПА), отечный (ОФ) и летальный (ЛФ) факторы. ПА обеспечивает транспорт ЛФ и ОФ во внутриклеточные компартменты, связываясь с Toll-подобными рецепторами (TLR) на клеточной мембране. ОФ, связав кальций и кальмодулин, выполняет функцию аденилатциклазы, превращающей аденозинтрифосфат (АТФ) в циклический аденозинмонофосфат (цАМФ). Накопление цАМФ приводит к отеку тканей и ингибированию функционального состояния нейтрофилов. ЛФ представляет собой протеазу, которая блокирует внутриклеточные сигнальные пути [2]. ЛФ угнетает пролиферацию иммунокомпетентных клеток, приводит к повреждению и апоптозу клеток. Все три компонента токсина действуют синергично. Капсульный полисахарид продуцируется плазмидой pXO2, благодаря которой возбудитель избегает завершённого фагоцитоза [7].

Генотипические и фенотипические признаки *Bacillus anthracis* подвержены внутривидовой и внутривидовой изменчивости, что связано с условиями существования, геномными мутациями, абберациями и диссоциациями. Поэтому среди изолятов сибиреязвенного микроба можно обна-

ружить атипичные по патогенности и некоторым свойствам штаммы. Это осложняет идентификацию и дифференциацию выделенного возбудителя, а также прогнозирование его эпидемической значимости. Существенный вклад в решение этой проблемы может внести изучение особенностей патогенеза и иммуногенеза изолятов сибиреязвенного микроба разного происхождения и с различным плазмидным составом.

Циклические нуклеотиды эндогенного происхождения в клетках макроорганизма функционируют как внутриклеточные вторичные посредники, реализующие передачу, амплификацию гормональных сигналов и опосредующие нейрогуморальную регуляцию многих физиологических процессов, в том числе иммунных [1]. На многие клеточные процессы цАМФ и циклический гуанозинмонофосфат (цГМФ) часто оказывают противоположное действие. Накопление цГМФ в иммунокомпетентных органах обычно связывают с пролиферацией, а повышение концентрации цАМФ с дифференцировкой иммунных клеток [8]. Величина соотношения концентраций цАМФ и цГМФ в клетках и органах иммунной системы может служить интегральным показателем иммунного статуса в инфекционном и вакцинальном процессах. Оценка особенностей патогенеза и поиск маркеров, которые могут быть интегральными показателями иммунного статуса макроорганизма при сибиреязвенной инфекции, обусловленной разными генотипами возбудителя, является актуальным направлением исследований и могут служить основой для совершенствования методов определения эпидемической значимости изолятов, а также внутривидовой таксономической принадлежности и источника инфекции.

Цель работы – исследовать активность циклических нуклеотидов и патологические изменения в иммунокомпетентных органах (тимус, селезенка) лабораторных животных в динамике инфекционного процесса, вызванного *B. anthracis* с разным плазмидным составом.

Материалы и методы

Объектом исследования служили четыре штамма *B. anthracis*, обладающие разным плазмидным спектром: *B. anthracis* И-275 (pXO1⁺; pXO2⁻) и *B. anthracis* И-217 (pXO1⁺; pXO2⁻) – изолированные из клинического материала людей; *B. anthracis* И-323 (pXO1⁺; pXO2⁻) – выделен из продукта животного происхождения; *B. anthracis* 34F₂ Stern (pXO1⁺; pXO2⁻) – вакцинный штамм. Исследования проводили на 260 белых мышах (четыре опытные и одна контрольная группы). Животных инфицировали спорами *B. anthracis* в дозе ЛД₅₀. Контрольной группе вводили изотонический раствор хлорида натрия pH-7,2. Отбор материала (селезенка и тимус) проводили на 3, 7, 14 и 21 сутки. Животных выводили из эксперимента в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных» (2016 г.) и Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых в экспериментах и других научных целях (Страсбург, 1986). Материал гомогенизировали в ступках с добавлением изотонического раствора хлорида натрия pH-7,2.

Оценку функционального состояния иммунокомпетентных клеток определяли методом твердофазного иммуноферментного анализа, используя коммерческие тест-системы «R&D systemsbio-technebbrand» (США). Концентрацию циклических нуклеотидов (ЦН) выражали в пмоль/г. Результаты учитывали в виде индекса соотношения (ИС), который вычисляли как соотношение концентраций цАМФ и цГМФ в опытной и контрольной пробах, выражали в условных единицах (усл. ед.) [5]. Статистическую обработку результатов выполняли, используя пакет прикладных программ «Statistica 6.0».

Для выражения степени патоморфологических изменений органов в числовых значениях была применена трехбалльная шкала, разработанная и предложенная Литусовым Н.В. с соавторами [4]. Каждому морфологическому изменению в зависимости от степени изменений присваивали определенное число баллов, что позволило вычислить итоговый индекс степени изменений (ИСИ) и дать сравнительную оценку патологических изменений у экспериментальных животных.

Результаты и обсуждения

Установлены статистически значимые различия ($p \leq 0,05$) продукции цАМФ и ИС цАМФ/цГМФ в тимусе и селезенке животных, инфицированных *B. anthracis* 34F₂ Stern на 3 сутки по сравнению с контролем (Рис.1, 2). А также в группе животных, инфицированных одноплазмидным штаммом *B. anthracis* И-217, где ИС цАМФ/цГМФ повышался более чем в 1,5 раза по сравнению с контролем ($p \leq 0,05$).

Вероятно, значительное повышение уровня цАМФ и ИС цАМФ/цГМФ в органах животных, инфицированных штаммом *B. anthracis* И-217, связано с патологическим действием сибиреязвенного экзотоксина. Снижение ИС цАМФ/цГМФ на 7 сутки в тимусе и селезенке животных, инфицированных *B. anthracis* И-217 и *B. anthracis* 34F₂ Stern (pXO1⁺; pXO2⁻), свидетельствует о повышении пролиферативного потенциала клеток в этот период.

Статистически значимых изменений ИС цАМФ/цГМФ в группе животных, инфицированных безплазмидными штаммами *B. anthracis* И-275 и *B. anthracis* И-323 во все сроки эксперимента не выявлено (Рис. 1, 2).

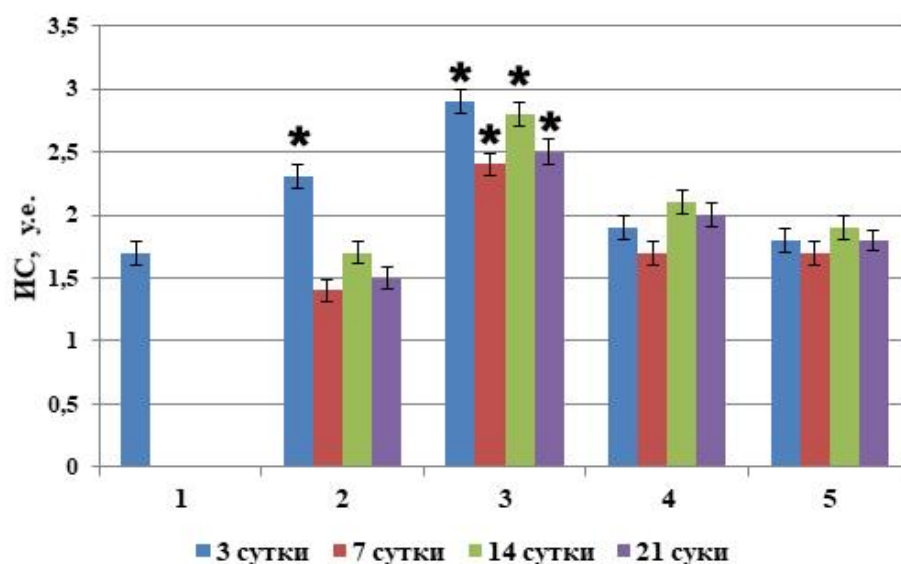


Рис. 1. Индекс соотношения цАМФ/цГМФ в тимусе белых мышей, инфицированных штаммами *B. anthracis* с разным плазмидным составом

1 – контроль (интактные животные); 2 – *B. anthracis* 34F₂ Stern;
3 – *B. anthracis* И-217; 4 – *B. anthracis* И-275; 5 – *B. anthracis* И-323

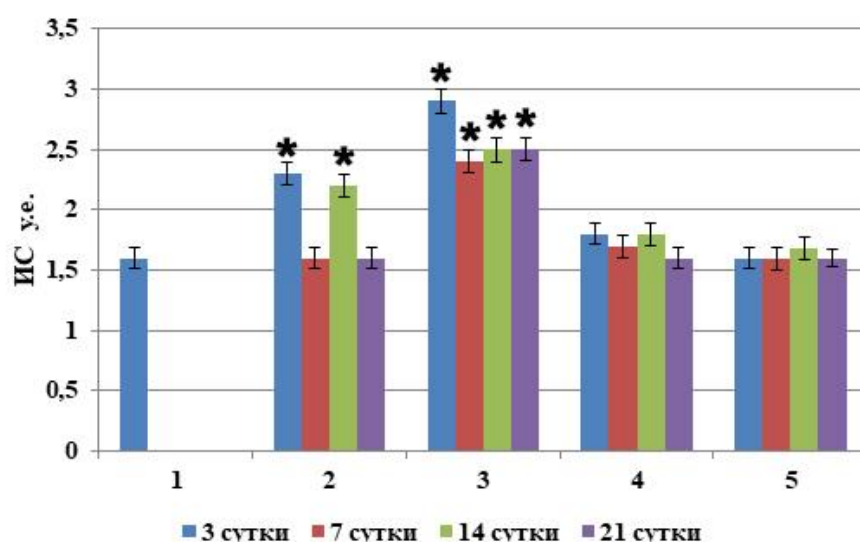


Рис. 2. Индекс соотношения цАМФ/цГМФ в селезенке белых мышей, инфицированных штаммами *B. anthracis* с разным плазмидным составом

1 – контроль (интактные животные); 2 – *B. anthracis* 34F₂ Stern;
3 – *B. anthracis* И-217; 4 – *B. anthracis* И-275; 5 – *B. anthracis* И-323

Установлено, что наиболее значительные патологические изменения в иммунокомпетентных органах лабораторных животных вызывал штамм *B. anthracis* И-217 во все сроки наблюдения (Рис. 3). На 14 сутки выявлено снижение ИСИ в 3,0-3,4 раза в тимусе и селезенке мышей, инфицированных *B. anthracis* 34F₂ Stern. Установлены незначительные изменения в органах экспериментальных животных, инфицированных безплазмидными штаммами *B. anthracis* И-275 и *B. anthracis* И-323. Так, патологические изменения в группе белых мышей, инфицированных *B. anthracis* И-323 появлялись на 3 сутки с последующим снижением показателей к 21 суткам (Рис.3). Максимальные показатели ИСИ в этих группах животных выявлены на 14 сутки у мышей, получивших *B. anthracis* И-275.

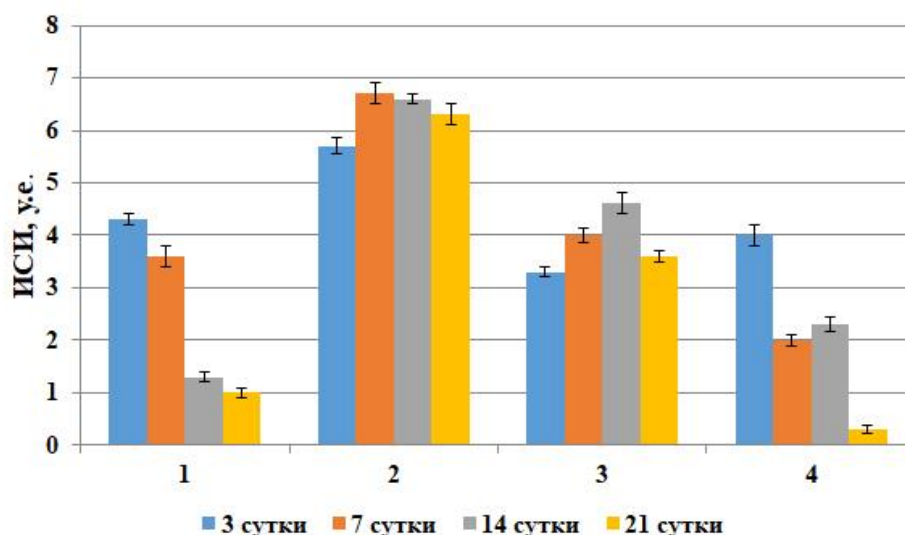


Рис. 3. Индекс степени патологических изменений в иммунокомпетентных органах лабораторных животных, инфицированных *B. anthracis* с разным плазмидным составом
1 – *B. anthracis* 34F₂ Stern; 2 – *B. anthracis* И-217; 3 – *B. anthracis* И-275; 4 – *B. anthracis* И-323

Экспериментально показано, что *B. anthracis* И-217 является самым реактогенным из четырех взятых в исследование штаммов. *B. anthracis* 34F₂ Stern вызывал повышение ИС цАМФ/цГМФ и изменения в органах только на 3 сутки наблюдения. Установлено, что *B. anthracis* И-275 и *B. anthracis* И-323 не оказывали влияние на ИС цАМФ/цГМФ в тимусе и селезенке, но вызывали патологические изменения в этих органах. При этом, динамика изменений в иммунокомпетентных органах у животных, инфицированных штаммом *B. anthracis* И-275 имела схожий характер с изменениями в группе мышей, инфицированных штаммом *B. anthracis* И-217. Возможно, это связано с факторами реактогенности, локализованными на хромосоме этих штаммов. Патологические изменения при экспериментальном инфекционном процессе аналогичны с патоморфологией реактивных процессов, вызванных авирулентными штаммами возбудителей. Некоторые авторы определяют вакцинный процесс как слабую форму инфекции, которая отличается от специфической инфекции лишь тем, что протекает доброкачественно [3].

Таким образом, в ходе исследований выявлены различия действия *B. anthracis* на функциональное состояние клеток иммунной системы (дифференцировка и пролиферация клеток), которые зависят от плазмидного состава сибиреязвенного микроба. Выявленные изменения ИС цАМФ/цГМФ в опытных и контрольной группах могут указывать на перспективность применения данного показателя при оценке выраженности инфекционного процесса.

Установлены морфологические изменения в иммунокомпетентных органах лабораторных животных при экспериментальной сибиреязвенной инфекции, которые проявляются разной степенью выраженности патологического процесса и активации иммунного ответа, обусловленные плазмидой рХО1⁺.

Литература

1. Дубровина В.И., Юрьева О.В., Пятидесятникова А.Б., Старовойтова Т.П., Коновалова Ж.А., Баранникова Н.Л. и др. Перспективы использования термоэкстрактов *Brucella abortus* И-206 в S- и L-формах в диагностике и профилактике бруцеллеза. *Acta biomedical scientific*. 2019; 4 (3): 96–101. DOI: 10.29413/ABS.2019-4.3.12.
2. Дубровина В.И., Старовойтова Т.П., Кравец Е.В., Иванова Т.А., Дугаржапова З.Ф., Гаврилова О.В. и др. Сравнительный анализ клеточного состава крови и костного мозга белых мышей, инфицированных *Bacillus anthracis* разных генотипов. *Acta biomedical scientific*. 2019; 5 (1): 72–77. DOI: 10.29413/ABS.2020-5.1.10.
3. Исупов И.В., Бугоркова С.А., Кутырев В.В. *Патоморфологические аспекты доклинических испытаний различных вакцин против чумы, сибирской язвы и холеры*. Саратов: ОАО «Приволжское книжное изд-во», 2004: 180
4. Литусов Н.В., Васильев Н.Т., Васильев П.Г., Евстигнеев В.И., Равилов А.З., Щербаков В.Н. и др. *Патоморфогенез сибирской язвы*. М.: Медицина, 2002: 240
5. Юрьева О.В., Дубровина В.И., Пятидесятникова А.Б., Старовойтова Т.П., Иванова Т.А., Корытов К.М. и др. Определение концентрации циклических нуклеотидов в гомогенатах органов и лизатах клеток лабораторных животных. – Иркутск: ФКУЗ Иркутск НИПЧИ, 2019: 20

6. Kanda N., Watanabe S. Intra-cellular 3', 5'-ad-enosine cyclic monophosphate level regulates house dust mite-induced interleukin-13 production by T-cells from mite-sensitive patients with atop-ic dermatitis. *J. Invest. Dermatol.* 2001; 116: 3–11. DOI: 10.1046/j.1523-1747.2001.01196.x.
7. Katharios-Lanwermyer S., Holty JE, Person MI, Sejvar J, Haberling D, Tubbs H, Meaney-Delman D, Pillai SK, Hupert N, Bower WA, Hendricks K, Katharios-Lanwermyer S. Identifying Meningitis During an Anthrax Mass Casualty Incident: Systematic Review of Systemic Anthrax Since 1880. *Clin Infect Dis.* 2016; 62 (12): 537–1545. DOI: 10.1093/cid/ciw184.
8. Ogunniyi AD, Paton JC, Kirby AC, McCullers JA, Cook J, Hyodo M, Hayakawa Y, Karaolis DK. C-di-GMP is an effective immunomodulator and vaccine adjuvant against pneumococcal infection. *Vaccine.* 2008; 26 (36): 4676–4685. DOI:10.1016/j.vaccine.2008.06.099.

Сведения об ответственном авторе:

Дубровина Валентина Ивановна – доктор биологических наук, заведующая лабораторией патофизиологии, ФКУЗ Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора, e-mail: dubrovina-valya@mail.ru,