

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2017

Е.В.Сазанова, Т.П.Шмелькова, А.Л.Кравцов, Т.А.Малюкова, Ю.А.Попов

ПРОТОЧНО-ЦИТОФЛУОРИМЕТРИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ЦИТОТОКСИЧНОСТИ ШТАММОВ *YERSINIA PESTIS*

Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов

Цель. Изучение цитотоксического воздействия штаммов *Yersinia pestis* с различной степенью вирулентности на лейкоциты цельной дефибрированной крови человека. *Материалы и методы.* В работе использовано 15 штаммов *Y. pestis*. ДНК-гистограммы регистрировали с помощью проточного цитофлуориметра. *Результаты.* Экспериментально обоснована возможность использования показателя цитотоксичности для дифференциации штаммов *Y. pestis* на вирулентные и авирулентные. Полученные данные сопоставимы с показателем LD₅₀ для мышей и не противоречат молекулярно-генетическим характеристикам штаммов. *Заключение.* Предлагаемый подход позволяет получать достоверные результаты и является перспективным для оценки вирулентности штаммов *Y. pestis*.

Журн. микробиол., 2017, № 6, С. 3—9

Ключевые слова: *Y. pestis*, вирулентность, апоптоз, проточная цитометрия

E.V.Sazanova, T.P.Shmelkova, A.L.Kravtsov, T.A.Malyukova, Yu.A.Popov

FLOW-CYTOFLUORIMETRIC ANALYSIS OF CYTOTOXICITY OF *YERSINIA PESTIS* STRAINS

Russian Research Institute for Plague Control «Microb», Saratov, Russia

Aim. Study cytotoxic effect of *Yersinia pestis* strains with various degree of virulence on leukocytes of whole defibrinated human blood. *Materials and methods.* 15 strains of *Y. pestis* were used in the study. DNA histograms were registered using flow cytofluorimeter. *Results.* Possibility of using cytotoxicity to differentiate *Y. pestis* into virulent and avirulent was experimentally proven. The data obtained was comparable with LD₅₀ for mice and did not contradict molecular-genetic characteristics of the strains. *Conclusion.* The approach proposed allows to obtain reliable results and is perspective for evaluation of virulence for *Y. pestis* strains.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2017, No. 6, P. 3—9

Key words: *Y. pestis*, virulence, apoptosis, flow cytometry

ВВЕДЕНИЕ

Возбудитель чумы является патогенным для человека микроорганизмом, относящимся к возможным агентам биотерроризма. Алгоритм идентификации штаммов *Y. pestis* включает комплекс регламентированных методов оценки вирулентности *in vitro* и *in vivo*, реализуемых на базе лабораторий регионального и федерального уровня [4]. Анализ *in vitro* позволяет продемонстрировать с помощью молекулярно-генетических методов наличие в геноме детерминант основных факторов патогенности изучаемого штамма, а с помощью

культурально-биохимических и иммунологических методов подтвердить их экспрессию. Применение биологического метода исследования (заражение мышей и морских свинок) дает возможность *in vivo* определить количественный показатель LD₅₀ и дать заключение о степени вирулентности на основании принятых критериев [8]: высоковирулентные штаммы — LD₅₀ для мышей при подкожном заражении — 5 — 10 м.к.; вирулентные — LD₅₀ более 10 м.к.; слабовирулентные — LD₅₀ более 1·10⁵ м.к.; авирулентные — LD₅₀ более 1·10⁶ м.к [3]. Кроме того, заражение двух видов лабораторных животных позволяет получить информацию о возможной избирательной вирулентности штамма. Однако полученная информация не позволяет оценить вирулентность микроорганизма для человека.

Цель работы — оценка цитотоксического воздействия штаммов *Y. pestis* на лейкоциты крови человека.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали вирулентные штаммы *Y. pestis*: 231; С-533; 748; М-586; И-3340; 400(290); авирулентные штаммы: 100Р6(36М5); КМ-130(3); КМ-260(12); 707; 521; А-819; 652; М-1813; вакцинный штамм EV линии НИИЭГ, а также штамм *Staphylococcus aureus* 209.

Штаммы *Y. pestis* выращивали на агаре Хоттингера pH 7,2 при (37±1)°С в течение 48 ч; штамм *S. aureus* 209 — на агаре Хоттингера pH 7,4 при температуре (37±1)°С в течение 24 ч. Взвесь бактериальных культур готовили в 0,9% физиологическом растворе по отраслевому стандарту мутности 10 единиц ГИСК им. Л.А.Тарасевича (ОСО 42-2859-86П), что соответствует 1·10⁹ м.к./мл. Необходимый объем венозной крови для эксперимента получали из локтевой вены невакцинированного против чумы донора, кровь дефибрировали и добавляли в нее микробную взвесь в соотношении V:V до получения концентрации 5·10⁸ м.к./мл крови. Параллельно ставили отрицательный контроль — кровь с физиологическим раствором и положительный — кровь с клетками *S. aureus* в концентрации 5·10⁸ м.к./мл крови. Образцы инкубировали в течение 48 ч при 37°С. Через 24 ч и 48 ч инкубации из каждого образца отбирали 100 мкл крови и проводили лизис эритроцитов деионизованной водой (3 мл). Через 15 с восстанавливали осмотический баланс пробы добавлением 1 мл 0,1 М фосфатно-солевого буфера с 0,6 М NaCl, pH 7,2. Пробы центрифугировали (100 g, 5 мин). Осадок (выделенные лейкоциты) дважды промывали добавлением 3 мл 0,15 М фосфатно-солевого буфера с 0,6 М NaCl, pH 7,2. Затем к осадку приливали 2 мл холодного 70% этилового спирта и хранили при 4°С до получения результатов контроля на специфическую стерильность. Контроль специфической стерильности проводили путем высева 0,1 мл взвеси на агар и в бульон Хоттингера (pH 7,2) с последующей инкубацией при температуре 28°С в течение 5 суток. Отсутствие роста *Y. pestis* свидетельствовало о специфической стерильности бактериальных проб.

Перед исследованием лейкоциты осаждали центрифугированием (400 g, 10 мин) и окрашивали в течение 15 мин смесью бромид этидия и митрамицина: 0,1 моль Трис-HCl буфера (pH 7,6) с добавлением 0,15 М NaCl, 0,04 М Mg Cl₂, 25 мкг/мл бромид этидия (Serva, Германия) и 50 мкг/мл митрамицина (Sigma, США) из расчета 1 мл раствора красителя на 10⁵ — 10⁶ лейкоцитов. ДНК-гистограммы лейкоцитов регистрировали с помощью проточного цитофлуориметра ICP-22 фирмы RNYWE (Германия) и подсчитывали гиподиплоидные лейкоциты (в апоптозе), несущие менее 2С

ДНК на клетку и обладающие пониженной интенсивностью ДНК-флуоресценции [11].

Статистическая обработка результатов включала определение среднего арифметического, средней ошибки среднего арифметического, достоверности различий (P) в процентах.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Дифференцировать штаммы *Y. pestis* по степени вирулентности позволяет методический подход, основанный на определении уровня их цитотоксичности по отношению к макрофагам лабораторных животных [5, 17] и в последние годы при оценке цитотоксичности штаммов *Y. pestis* широко используют проточную цитофлуориметрию, обеспечивающую наиболее быстрый и эффективный подсчет числа апоптотических клеток в культурах макрофагов, обсемененных *Y. pestis* [9]. Макрофаги, погибшие при взаимодействии с *Y. pestis* в процессе развития фагоцитарной реакции, легко могут быть идентифицированы как фагоциты, несущие менее 2С ДНК на клетку [2], которые учитываются на ДНК-гистограммах слева от диплоидного пика G1/Go [6].

Однако в образцах крови человека подавляющее число фагоцитов (более 90%) — это не макрофаги, а полиморфноядерные лейкоциты (нейтрофильные гранулоциты), функция которых на ранней стадии инфекционного процесса полностью подавляется факторами вирулентности *Y. pestis* [16]. Подавляется не только фагоцитоз, но и ранний апоптоз нейтрофилов [15], что приводит к длительной отсрочке гибели этих клеток в условиях *in vivo* [10], к массивному апоптозу лейкоцитов, индуцируемому циркулирующими в крови устойчивыми к фагоцитозу *Y. pestis* и, как следствие, к неизбежному массивному постапоптотическому аутолизу (вторичному некрозу) лейкоцитов на стадии генерализации чумного инфекционного процесса [13]. Считается,

что длительная задержка гибели нейтрофилов лежит в основе быстрого развития системного воспаления при первичной легочной чуме и играет решающую роль в патогенезе чумы [14].

Имеются единичные работы, посвященные изучению динамики гибели лейкоцитов в образцах цельной крови человека, обсемененных живыми *Y. pestis* [7, 11].

Характеристика вирулентности штаммов *Y. pestis*

Наименование штамма	Геновариант	LD ₅₀ для мышей, м.к.	Кол-во апоптотических клеток (M±m),%	
			24 ч	48 ч
Вирулентные				
231	pPst ⁺ pFra ⁺ pCad ⁺ Pgm ⁺	25—50 м.к.	42±6,22	91,33±4,56
C-533	pPst ⁺ pFra ⁺ pCad ⁺ Pgm ⁺	31 м.к.	17±4,4	87±2,56
748	pPst ⁺ pFra ⁺ pCad ⁺ Pgm ⁺	25 м.к.	15,6±4,2	89±6,4
M-586	pPst ⁺ pFra ⁺ pCad ⁺ Pgm ⁺	32 м.к.	24,33±5,8	88,33±6,12
I-3340	pPst ⁺ pFra ⁺ pCad ⁺ Pgm ⁺	112 м.к.	17±2,12	89,33±5,55
400 (290)	pPst ⁺ pFra ⁺ pCad ⁺ Pgm ⁺	1·10 ⁴	21±5,39	83,33±3,91
Авирулентные				
A-819	pPst ⁻ pFra ⁺ pCad ⁻ Pgm ⁻	>10 ⁹	18,33±3,34	76,66±7,65
652 «Гризель»	pPst ⁻ pFra ⁺ pCad ⁺ Pgm ⁺	2,15·10 ⁶	16,33±2,37	49±2,94
100P6(36M5)	pPst ⁻ pFra ⁺ pCad ⁺ Pgm ⁻	1,47·10 ⁸	13,33±2,44	30,33±1,73
M-1813	pPst ⁺ pFra ⁺ pCad ⁺ Pgm ⁻	1·10 ⁸	9,66±1,22	41,66±5,07
707 «Касуга»	pPst ⁺ pFra ⁺ pCad ⁻ Pgm ⁺	1·10 ⁹	7,66±3,78	44,33±7,35
521	pPst ⁺ pFra ⁺ pCad ⁺ Pgm ⁻	>10 ⁹	2,33±0,33	2,66±0,33
260 (12)	pPst ⁻ pFra ⁻ pCad ⁻ Pgm ⁺	>10 ⁹	11,66±1,48	18±2,35
KM-130 (3)	pPst ⁻ pFra ⁺ pCad ⁻ Pgm ⁻	>10 ⁹	5,38±0,89	10±3,27
EV	pPst ⁺ pFra ⁺ pCad ⁺ Pgm ⁻	>10 ⁹	9±0,58	24±0,19
Контроль отр.			3,36±0,89	5±1,17
Контроль пол.			51,3±3,82	68±3,27

Результаты этих работ подтверждают неспособность *Y. pestis*, в отличие от золотистого стафилококка, быстро индуцировать интенсивную гибель нейтрофилов по типу апоптоза. Установлены различия в интенсивности цитотоксического эффекта, индуцированного в крови человека вирулентным, вакцинным и авирулентным штаммами *Y. pestis*. По данным проточной цитометрии под влиянием устойчивых к фагоцитозу *Y. pestis* нейтрофилы человека погибали по типу позднего апоптоза — в интервале времени от 24 ч до 48 ч инкубации. Однако использование небольшой выборки штаммов не позволило рассчитать пороговый показатель для дифференциации вирулентных и авирулентных штаммов.

В табл. представлены результаты дифференцировки штаммов на вирулентные и авирулентные по данным ПЦР-анализа и по расчетам показателя LD_{50} . Их сравнивали с результатами проточно-цитофлуориметрического ДНК-анализа.

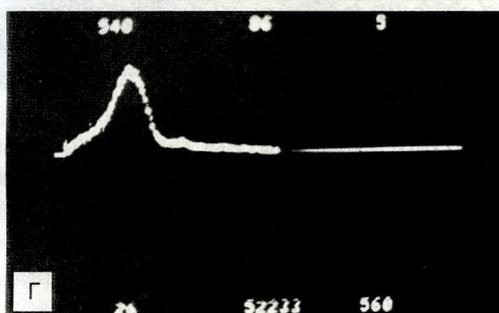
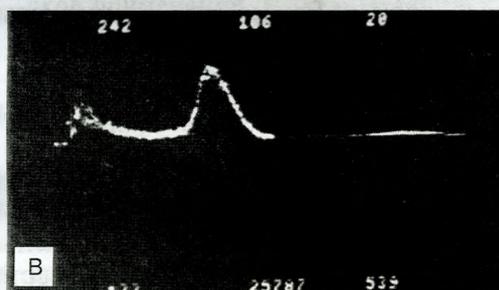
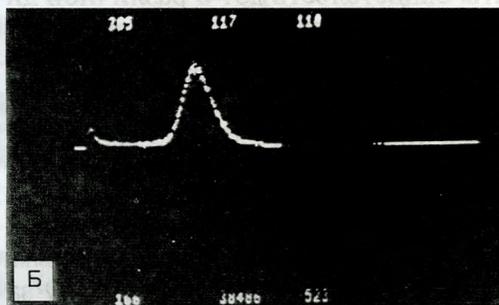
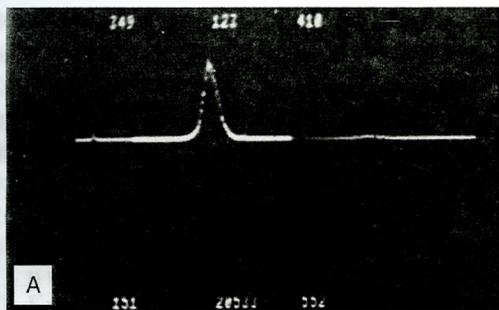
Анализ ДНК-гистограмм начинали с оценки контрольных образцов. В отрицательном контроле через 24 ч инкубации при $37^{\circ}C$ лейкоциты фактически не подвергались апоптозу. В положительном контроле был зарегистрирован интенсивный цитотоксический эффект, что подтвердило полученные ранее данные [7, 11].

ДНК-гистограммы образцов, содержащих клетки *Y. pestis* и подвергшиеся инкубации в течение 24 часов, сопоставляли с данными положительного и отрицательного контроля. Использование *S. aureus* дало возможность сравнить цитотоксические свойства бактерий, инфицирование которыми сопровождается завершенным фагоцитозом, быстрым апоптозом и лизисом нейтрофилов (в течение первых 6 — 8 ч), с цитотоксичностью возбудителя чумы, взаимодействие которого с макроорганизмом характеризуется незавершенным фагоцитозом, отсрочкой гибели нейтрофилов [15] и, как следствие, длительной задержкой развития воспалительного процесса (до 36 — 48 ч) [10].

В ходе эксперимента отмечено, что все ДНК-гистограммы, полученные при анализе образцов крови, содержащих клетки возбудителя чумы, характеризовались, в сравнении с золотистым стафилококком, затяжным (постепенным) развитием цитотоксического эффекта с проявлением максимальных различий для вирулентных и авирулентных штаммов к 48 ч инкубации.

Было выявлено три варианта индукции апоптоза лейкоцитов крови человека под влиянием штаммов *Y. pestis* (табл.). Первый вариант характеризовался фактическим отсутствием цитотоксического действия к 24 ч; количество апоптотических клеток при этом было очень близко к контролю ($P \geq 0,05$). В данную группу вошли авирулентные штаммы *Y. pestis* КМ-130 (3); 707 «Касуга»; 521. Второй вариант проявлялся более высокой цитотоксичностью, превосходящей данные отрицательного контроля от 3 до 8 раз. Группу составили 11 штаммов *Y. pestis* как вирулентных, так и авирулентных. Третий вариант развития апоптоза лейкоцитов демонстрировал штамм *Y. pestis* 231 (708) — интенсивный апоптоз лейкоцитов, превышающий в 11,5 раза показатель отрицательного контроля.

При исследовании образцов, подвергшихся инкубации в течение 48 часов, во всех образцах, содержащих вирулентные штаммы *Y. pestis*, была зафиксирована массовая гибель лейкоцитов. Среднее значение показателя повреждения лейкоцитов составило $88,05 \pm 1,12\%$. Аналогичный показатель для авирулентных штаммов был в 2,7 раза ниже и составил $32,96 \pm 7,57\%$. При этом интенсивность повреждения лейкоцитов вирулентными штаммами превысила результаты отрицательного контроля в 18 раз, а авирулентными — в 15



Различная интенсивность повреждения лейкоцитов крови человека, инфицированной штаммами *Y. pestis* с различными биологическими свойствами.

По оси абсцисс — содержание ДНК на клетку в усл. ед. интенсивности ДНК флуоресценции (каналах). По оси ординат — кол-во клеток (импульсов) на ед. измерения (канал). Основной пик представлен диплоидными клетками с содержанием ДНК 2С, которые находятся на постмитотической (G0) и предсинтетической (G1) стадиях клеточного цикла. Слева от диплоидного пика — лейкоциты, содержащие менее 2С ДНК на клетку. А, Б — контр. отр., исходный и после 48 ч инкубации соответственно; В — авирулентный штамм *Y. pestis* М-1813 после 48 ч инкубации; Г — вирулентный штамм *Y. pestis* М-586 после 48 ч инкубации.

раз. Проведенная нами статистическая обработка показала высокую степень достоверности ($p < 0,05$) различий показателей апоптоза лейкоцитов крови как в исследуемых группах, так и с контрольными образцами. Различия в интенсивности повреждения лейкоцитов крови человека вирулентными и авирулентными штаммами отражают характерные ДНК гистограммы, представленные на рисунке.

Следует отметить, что штаммы *Y. pestis* 100P6(36M5); М-1813; 707 «Касуга»; 652 «Гризель» продемонстрировали средний результат интенсивности повреждения лейкоцитов по сравнению со всей группой штаммов *Y. pestis*. Полученные данные согласуются с данными о наличии детерминант вирулентности. В геноме каждого из этих штаммов, за исключением *Y. pestis* 652 «Гризель», отсутствуют гены, детерминирующие один из основных факторов патоген-

ности. Обращает на себя внимание штамм *Y. pestis* A-819, который по данным ПЦР (отсутствие в геноме основных детерминант вирулентности) и биологического метода исследования на мышах ($LD_{50} > 10^9$ м.к.) был отнесен к группе авирулентных. Вместе с тем, при анализе ДНК-гистограмм, полученных методом проточной цитометрии в опытах с лейкоцитами крови человека, для данного штамма был определен высокий показатель цитотоксичности, а именно $76,77 \pm 7,65\%$ погибших лейкоцитов через 48 ч инкубации. Возможно, это обусловлено индивидуальными генетическими перестройками, что требует дополнительного исследования.

В целом, полученные нами результаты свидетельствуют о различной динамике и интенсивности гибели лейкоцитов в крови людей, обсемененной живыми клетками вирулентных и авирулентных штаммов *Y. pestis*. На основании имеющихся показателей можно предположить, что пороговым значением для отнесения штамма возбудителя чумы к вирулентным является наличие в исследуемом образце крови (к 48 ч инкубации при 37°C) более 80% апоптотических клеток, к авирулентным — менее 50%.

Это согласуется с литературными данными о пороговых значениях индексов дегградации лейкоцитов крови у пациентов с тяжелыми бактериальными инфекциями, когда бактериемия приводит к неблагоприятному исходу заболевания в результате развития тяжелого сепсиса. Важно, что клиницисты предполагают высокую степень тяжести инфекции и серьезный прогноз только в тех случаях, когда более чем в 50% лейкоцитов крови человека появляются характерные для апоптоза дегенеративные изменения ядра и цитоплазмы [1, 12].

Результаты определения цитотоксичности 15 штаммов *Y. pestis* были сопоставлены с данными молекулярно-генетической оценки их вирулентности (ПЦР, плазмидный скрининг). При этом не выявлено прямой связи величины показателя цитотоксичности штаммов с их плазмидными профилями. Вместе с тем, все штаммы *Y. pestis*, имеющие две основные детерминанты вирулентности (плазмиду *pCad*, хромосомную область *pgm*), обладали более выраженным повреждающим эффектом на лейкоциты крови человека в условиях *in vitro*. Штаммы, утратившие «остров высокой патогенности» либо плазмиду *pCad*, обладали сниженной вирулентностью или авирулентностью по данным биологического метода и не индуцировали массивную гибель лейкоцитов в образцах цельной крови человека.

Результаты сравнительного анализа показателей цитотоксичности штаммов *Y. pestis* и их LD_{50} для мышей свидетельствуют об их высокой корреляции.

Оценка цитотоксического эффекта штаммов возбудителя чумы на лейкоциты крови человека в системе *in vitro* позволяет получать достоверные результаты и является перспективным подходом для оценки вирулентности. С целью установления пороговых значений для дифференциации штаммов на авирулентные и вирулентные (возможно, слабо- и высоковирулентные) необходимо продолжить исследования в плане увеличения выборки штаммов возбудителя чумы, в первую очередь, за счет слабовирулентных штаммов ($LD_{50} > 1 \cdot 10^5$ м.к.), а также штаммов авирулентных.

Полученные нами экспериментальные данные коррелируют с критериями регламентированного метода оценки вирулентности *in vivo* на мышах и не противоречат молекулярно-генетическим характеристикам штаммов (исключение составил штамм *Y. pestis* A-819).

Таким образом, предлагаемый подход, позволяющий моделировать условия, приближенные к организму человека и получать достоверные результаты, является перспективным для оценки вирулентности штаммов *Y. pestis* и дополнения комплекса регламентированных методов изучения их вирулентности.

ЛИТЕРАТУРА

1. Козинец Г.И., Высоцкий В.В., Погорелов В.М., Еровиченков А.А., Малов В.А. Кровь и инфекция. М., Триада-Фарм, 2001.
2. Кравцов А.Л., Пилипенко Т.Ю., Коровкин С.А., Наумов А.В. Способ оценки фагоцитоза. А.с. 1522923 СССР, МКИ G 01 № 33/53. № 4014143. Изобретения. 1994, 4: 187.
3. Лабораторная диагностика опасных инфекционных болезней. Практическое руководство. Г.Г.Онищенко, В.В. Кутырев (ред.). М., Шико, 2013.
4. Порядок организации и проведения лабораторной диагностики чумы для лабораторий территориального, регионального и федерального уровней. Методические указания. МУК 4.2.2940-11.
5. Пустовалов В.Л., Васильева Г.И., Киселева А.К. Устойчивость к фагоцитозу штаммов чумного микроба в зависимости от температуры культивирования. Вопросы профилактики природноочаговых инфекций. Саратов, 1983, с. 16-21.
6. Хайдуков С.В., Зурочка А.В. Вопросы современной проточной цитометрии. Клиническое применение. Изд-во Челябинская государственная медицинская академия, Челябинск, 2008.
7. Шмелькова Т.П., Кравцов А.Л., Шуковская Т.Н., Ляпин М.Н., Костюкова Т.А., Малюкова Т.А., Головки Е.М., Видяева Н.А., Коннов Н.П. Влияние биологических свойств чумного микроба на развитие апоптоза лейкоцитов крови человека в системе *in vitro*. Проблемы особо опасных инфекций. 2007, 1: 85-89.
8. Шмелькова Т.П., Сазанова Е.В., Кравцов А.Л., Малюкова Т.А., Попов Ю.А., Бойко А.В., Девдариани З.Л., Шуковская Т.Н. Определение вирулентных свойств патогенных микроорганизмов *in vitro*: состояние вопроса. Журн. микробиол. 2016, 6: 100-110.
9. Bashaw J., Norris S., Weeks S. et al. Development of *in vitro* correlate assay of immunity to infection with *Yersinia pestis*. Clin. And. Vaccine Immunology. 2007, 14 (5): 605-616.
10. Bubeck S.S., Cantwell A.M., Dube P.H. Delayed inflammatory response to primary pneumonic plague occurs in both outbred and inbred mice. Infection and Immunity. 2007, 75 (2): 697-705.
11. Kravtsov A.L., Grebenyukova T.P., Bobyleva E.V. et al. Flow cytofluorometric assay of whole blood leukocyte DNA degradation in response to *Yersinia pestis* and *Staphylococcus aureus*. Proceedings of SPIE. 2001, 4241: 260-267.
12. Parrino J., Hotchkiss R.S., Bray M. Prevention of immune cell apoptosis as potential therapeutic strategy for severe infections. Emerg. Infect. Dis. 2007, 13 (2): 191-198.
13. Silva T.M. et al. Secondary necrosis in multicellular animals: an outcome of apoptosis with pathogenic implications. Apoptosis. 2008, 13: 463-482.
14. Silva T.M. Bacteria-induced phagocyte secondary necrosis as a pathogenicity mechanism. J. Leuk. Biology. 2010, 88 (5): 885-896.
15. Spinner J.L., Seo K.S., O'Loughlin J.L. et al. Neutrophils are resistant to *Yersinia YopJ/P*-induced apoptosis and are protected from ROS-mediated cell death by the type III secretion system. PLoS ONE. 2010, 5(2): e9279. Doi: 10.1371/journal.pone.0009279.
16. Spinner J.L., Cundiff J.A., Kobayashi S.D. *Yersinia pestis* type III secretion system-dependent inhibition of human polymorphonuclear leukocyte function. Infect. Immunity. 2008, 76 (8): 3754-3760.
17. Zhang Y., Bliska B. Role of macrophage apoptosis in the pathogenesis of *Yersinia*. Curr. Top. Microb. Immunol. 2005, 289: 151-174.

Поступила 10.04.17

Контактная информация: Сазанова Елена Владимировна,
410005, Саратов, ул. Университетская, 46, р.т. (8452) 51-52-30