

Литература

- Исачкова (Сомова) Л.М., Жаворонков А.А., Антоненко Ф.Ф. Патология псевдотуберкулеза. Владивосток: Дальнаука, 1994. 190 с.
- Исачкова (Сомова) Л.М., Прокопенкова А.П., Плехова Н.Г., Горшкова Р.П. О биологическом действии эндотоксина *Yersinia pseudotuberculosis* // Журн. микробиол. 1990. № 10. С. 7–11.
- Исачкова (Сомова) Л.М., Тимченко Н.Ф., Недашковская Е.П., Разник С.Д. Патоморфологическая характеристика экспериментальной токсинемии, вызванной термостабильным токсином *Yersinia pseudotuberculosis* // Бюл. exper. биол. и мед. 2000. № 11. С. 593–597.
- Недашковская Е.П. Выделение, очистка и некоторые свойства термолабильного летального токсина *Y. pseudotuberculosis* // Проблемы инфекционной патологии в Сибири, на Дальнем Востоке и Крайнем Севере. Новосибирск, 1996. С. 16–17.
- Пашин А.Ю., Джапаридзе М.Н., Пономарев Н.Г., Веренков М.С. Совершенствование способов выявления экзотоксина псевдотуберкулезного микроба и гомологичных к нему антител // Акт. вопр. лаб. диагностики и биохимии возбудителей чумы и холеры: сб. науч. трудов. Саратов, 1984. С. 14–18.
- Сомов Г.П., Покровский В.И., Беседнова Н.Н., Антоненко Ф.Ф. Псевдотуберкулез. М.: Медицина, 2001. 254 с.
- Тимченко Н.Ф. Токсины *Yersinia pseudotuberculosis* // Журн. микробиол. 2006. № 6. С. 83–89.
- Тимченко Н.Ф., Недашковская Е.П., Долматова Л.С., Сомова-Исачкова Л.М. Токсины *Yersinia pseudotuberculosis*. Владивосток: Примполиграфкомбинат, 2004. 218 с.
- Black D.S., Marie-Cardine A., Scharaven B., Bliska J.B. The *Yersinia tyrosine phosphatase YopH targets a novel adhesion-regulated signaling complex in macrophages* // Mol. Microbiol. 2000. Vol. 37, No. 3. P. 515–527.
- Carnoy C., Mullet C., Muller-Alouf H. Superantigen YPma exacerbates the virulence of *Yersinia pseudotuberculosis* in mice // Infect. Immun. 2000. Vol. 68, No. 5. P. 2553–2559.
- El-Achkar T.M., Hosein M., Dagher P.C. Pathways of renal injury in systemic gram-negative sepsis // J. Clin. Invest. 2008. Vol. 38, No. 2. P. 39–44.
- Falkao D.P., Correa E.F., Falkao G.P. *Yersinia* spp. In the environmental: epidemiology and virulence characteristics // Adv. Exp. Med. Biol. 2003. Vol. 529. P. 341–343.
- Munford R.S. Severe sepsis and septic shock: the role of gram-negative bacteremia // Ann. Rev. Pathol. 2006. No. 1. P. 467–496.

Поступила в редакцию 24.02.2010.

PATHOMORPHOLOGICAL CHANGES IN CASE OF EXPERIMENTAL TOXEMIA CAUSED BY THERMOLABILE TOXIN *YERSINIA PSEUDOTUBERCULOSIS*

L.M. Somova, N.G. Plekhova, E.I. Drobot, E.P. Nedashkovskaya, N.F. Timchenko

Research Institute of Epidemiology and Microbiology, SB RAMS (1 Selskaya St. Vladivostok 690087 Russia)

Summary – The thermolabile toxin *Yersinia pseudotuberculosis* is a species protein with molecular mass of 200 kDa that exhibits immunogenic and allergic properties and is capable of causing local dermonecrotic response and laboratory animals' death, when parenterally infused. The paper characterizes pathomorphology of experimental toxemia caused by intraperitoneal introduction of this toxin in the concentration of 1.52 mgk/mouse (5 LD₅₀). As reported, the thermolabile toxin bears direct relation to the progress of infectious-toxic shock in case of pseudotuberculosis. It plays key role in causing direct damaging effect on endothelium of microvessels and cells of parenchymatous organs that tends to be worsened by circulatory hypoxia. The authors indicate severe dystrophic and necrotic changes in organs, liver and kidneys mostly, that are main detoxification barriers when the toxin is introduced intraperitoneally.

Key words: *yersinias*, thermolabile toxin, infectious-toxic shock, pathomorphology.

Pacific Medical Journal, 2010, No. 3, p. 67–72.

УДК 612.017.4:616-002.71:582.232/.275

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ *YERSINIA PSEUDOTUBERCULOSIS* С МОРСКИМИ ОДНОКЛЕТОЧНЫМИ ВОДОРΟΣЛЯМИ

Н.Ф. Тимченко¹, М.Г. Елисейкина², Н.А. Айздайчер²

¹ НИИ эпидемиологии и микробиологии СО РАМН (690087 г. Владивосток, ул. Сельская, 1),

² Институт биологии моря имени А.В. Жирмунского ДВО РАН (690041 г. Владивосток, ул. Пальчевского, 17)

Ключевые слова: *Yersinia pseudotuberculosis*, морские одноклеточные водоросли, взаимодействие, электронная микроскопия.

С помощью трансмиссионной электронной микроскопии показан в динамике характер взаимодействия вирулентных для человека и теплокровных животных *Yersinia pseudotuberculosis* I и III сероваров с морскими одноклеточными водорослями *Plagioselmis prolonga* Butch. (Cryptophyta), *Porphyridium cruentum* Naeg. (Rhodophyta), *Platymonas* spp. (Chlorophyta) и *Dunaliella salina* Teod. (Chlorophyta). Установлено, что бактерии и водоросли взаимодействовали в условиях эксперимента, а исход процесса в значительной степени зависел от структурной организации клеток водоросли, в частности наличия защитной оболочки. При контакте бактерий с *D. salina* и *P. prolonga*, не имеющих наружной защитной оболочки, *Y. pseudotuberculosis* вызыва-

ли лизис и разрушение их клеток. При взаимодействии с данными видами микроводорослей *Y. pseudotuberculosis* использует факторы патогенности с адгезивной и токсической функциями. При взаимодействии с *P. cruentum* и *Platymonas* spp., обладающими наружной защитной оболочкой, клетки повреждались.

Наземные растения играют значительную роль в экологии *Yersinia pseudotuberculosis* и эпидемиологии вызываемой ею инфекции [8]. Микроорганизмы часто обнаруживаются на растительных субстратах, они размножаются на овощах и корнеплодах и в овощных соках при пониженной температуре [3]. При использовании каллусных культур клеток выявлено, что *Y. pseudotuberculosis* проникает в межклеточные пространства и внутрь клеток

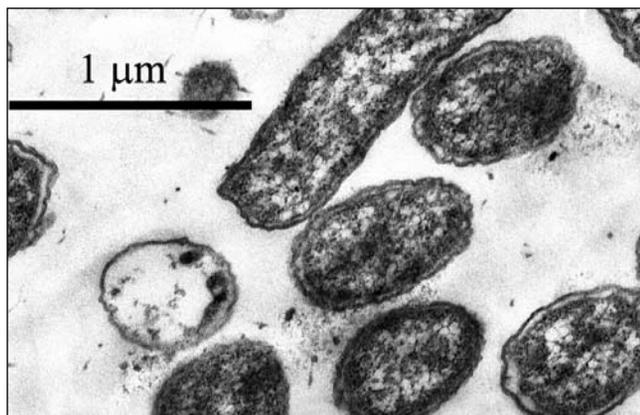


Рис. 1. Морфология *Y. pseudotuberculosis* (штамм 512) перед внесением в среду Гольдберга («норма»). Электронная микроскопия.

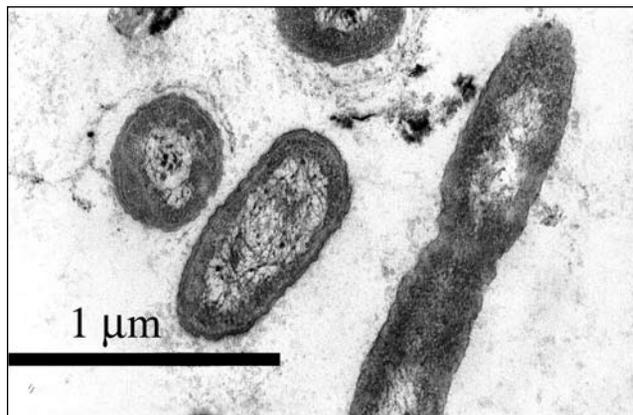


Рис. 2. Морфология *Y. pseudotuberculosis* (штамм 512) в среде Гольдберга (без микроводорослей), 1 час после начала эксперимента. Электронная микроскопия.

капусты белокочанной (*Brassica oleracea* L.) и женьшеня настоящего (*Panax ginseng* C.A. Mey), длительное время сохраняя жизнеспособность и повреждая клетки [10]. В ассоциации с зелеными (*Scenedesmus quadricauda*) и сине-зелеными (*Anabaena variabilis*) водорослями почвы и пресных водоемов бактерии псевдотуберкулеза могут переходить в покоящееся (некультивируемое) состояние [2, 7].

В литературе имеются сообщения о выделении разных видов иерсиний из морской воды и морских гидробионтов [3, 4, 13]. В экспериментах показано, что в морской воде (соленость 32‰) бактерии псевдотуберкулеза живут недолго, но могут длительно выживать в опресненной воде (до 16‰), а также в организме гидробионтов, в том числе представителей иглокожих: морских ежей (*Strongylocentrotus nudus*) и голотуриях – кукумари-обманщице (*Eupentacta fraudatrix*) и дальневосточном трепанге (*Apostichopus japonicus*) [10]. Ввиду высокой приспособляемости бактерий рода *Yersinia* к факторам и условиям внешней среды в настоящее время обсуждаются вопросы возможности их обитания в морской среде и значимости этого феномена в эпидемиологии и микробиологии псевдотуберкулеза [3].

На примере *Listeria monocytogenes*, возбудителя листериоза, показано, что патогенные бактерии могут использовать в своих трофических целях отдельные виды морских микроводорослей [9]. Известно, что микроводоросли играют важную роль в экосистемах, являясь первым звеном пищевой цепи и источником органического вещества [1]. С учетом имеющихся данных о роли растений в экологии *Y. pseudotuberculosis* и эпидемиологии псевдотуберкулеза, о способности этих бактерий длительное время выживать в организме гидробионтов, целью настоящей работы явился анализ взаимодействия *Y. pseudotuberculosis* с морскими одноклеточными водорослями в условиях эксперимента. Полученные данные необходимы для понимания возможного характера их взаимоотношений с иерсиниями в условиях морских экосистем.

Материал и методы. Использованы штаммы *Y. pseudotuberculosis* 512 (pYV+) серовар 1 и 2517 (pYV+) серовар III из коллекции живых культур НИИЭМ СО РАН. Для исследования бактерии выращивали на питательном агаре при температуре 20–22°C в течение 16–18 часов.

В работу взяты альгологически чистые культуры одноклеточных водорослей 4 видов, принадлежащих к разным систематическим группам: *Plagioselmis prolunga* Butch. (Cryptophyta), *Porphyridium cruentum* Naeg. (Rhodophyta), *Platymonas* spp. (Chlorophyta), *Dunaliella salina* Teod. (Chlorophyta). Водоросли получены из коллекции Института биологии моря имени А.В. Жирмунского ДВО РАН. Культуры микроводорослей выращивали в питательной среде Гольдберга (основа – морская вода соленостью 32‰) [11] при температуре 20±2°C и освещении 70 мкмоль/м²×с с флуоресцентными лампами со светотемновым периодом: 12 часов – свет, 12 часов – темнота.

Бактериальную взвесь в 0,85%-ном растворе NaCl разводили по стандарту мутности ГИСКБП им. Л.А. Тарасевича до содержания 10⁵ мк/мл. Число клеток водорослей подсчитывали в камере Горяева и выражали его как $n \times 10^4$ кл./мл. Водоросли и бактерии вносили в среду Гольдберга в соотношении 1:1. Системы инкубировали при температуре 20–22°C, благоприятной для бактерий и водорослей, в течение 1 и 24 часов.

Для электронной микроскопии образцы фиксировали в глutarовом альдегиде, добавляя его в среду через 1 и 24 часа после начала опыта так, чтобы конечная концентрация фиксатора в образце составляла 2,5%. Материал дофиксировали в 1%-ном растворе OsO₄ на морской воде и заключали в эпон-аралдит по общепринятой методике [6]. Ультратонкие срезы изготавливали на ультрамикротоме Ultracut E, контрастировали уранил-ацетатом и цитратом свинца и анализировали в просвечивающем электронном микроскопе JEM-100B.

Результаты исследования. В исходных культурах клетки *Y. pseudotuberculosis* имели строение,

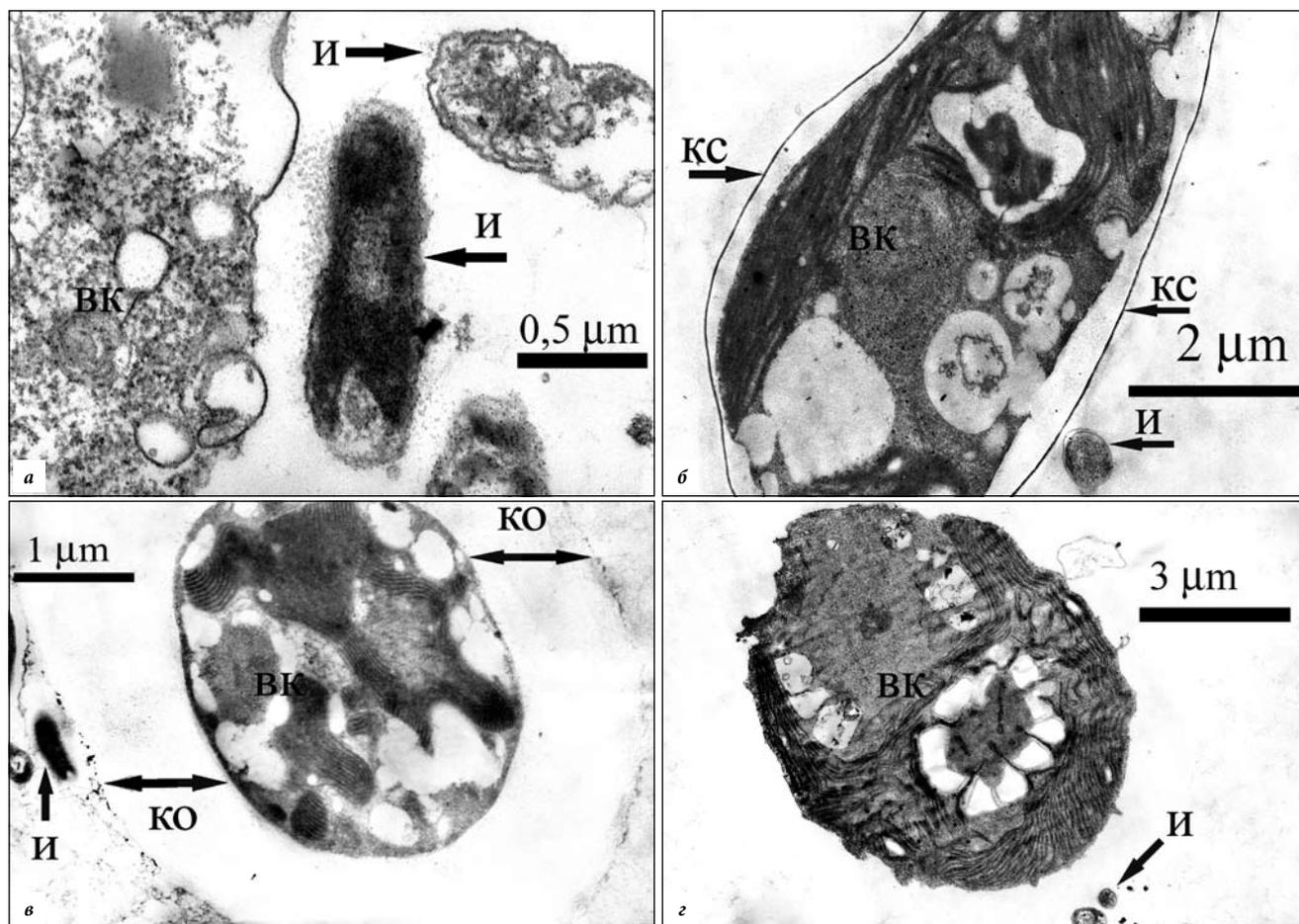


Рис. 3. Взаимодействие *Y. pseudotuberculosis* (штамм 512) с морскими одноклеточными водорослями:

а – контакт бактерий с поверхностью клеток *D. salina*, 1 час после начала совместного культивирования; б – лизис клеток *D. salina*, 24 часа совместного культивирования с иерсиниями; в – электронно-прозрачная защитная полисахаридная оболочка микроводоросли *P. cruentum*, 24 часа совместного культивирования с микроорганизмами; г – отсутствие контактов между клетками *P. prolonga* и *Y. pseudotuberculosis*, 1 час совместного культивирования. Электронная микроскопия. Условные обозначения: и – иерсинии, вк – клетки водорослей, ко – электронно-прозрачная оболочка клеток водорослей, кс – клеточная стенка водорослей.

типичное для S-форм грамотрицательных бактерий (рис. 1). Однако при помещении в гипертоническую для них среду Гольдберга микроорганизмы претерпевали характерные изменения. Наблюдались уплотнение цитоплазмы бактериальных клеток, образование четко выраженной зоны нуклеоида, появление вакуолей и плотных включений в цитоплазме (рис. 2).

При совместном культивировании морских зеленых и красных одноклеточных водорослей видов *D. salina*, *P. cruentum*, *Platymonas* spp. с *Y. pseudotuberculosis* уже в течение первого часа выявлены контакты между бактериями и микроводорослями (рис. 3, а). В случае с *D. salina*, не имеющей плотной оболочки [5], прямой контакт микроорганизмов с наружной мембраной клеток микроводоросли приводил к разрушению последних уже через 24 часа после начала эксперимента. Напротив, наличие плотной оболочки у *Platymonas* spp. предохраняло клетки микроводоросли от воздействия иерсиний и их токсинов (рис. 3, б). Клетки красной водоросли *P. cruentum* имели электронно-прозрачную желеобразную поли-

сахаридную капсулу, также выполняющую защитную функцию (рис. 3, в).

Иной характер взаимодействия с иерсиниями наблюдался в культуре *P. prolonga*. В течение первого часа контакты между растительными и бактериальными клетками отсутствовали (рис. 3, г). Однако уже через 24 часа в культуре практически не осталось неповрежденных клеток водорослей. У иерсиний в этот период выявлены вакуоли в цитоплазме и усиление сегрегации ее на электронно-плотную примембранную часть и ДНК-содержащую зону нуклеоида. Следовательно, *Y. pseudotuberculosis* оказывали токсическое действие на клетки *P. prolonga*, вызывая их лизис, а метаболиты водорослей, образующиеся при разрушении, в свою очередь, негативно влияли на бактерии. Обнаружено, что характер взаимодействия *Y. pseudotuberculosis* с исследованными видами микроводорослей не зависел от серологического варианта микроорганизмов.

Обсуждение полученных данных. Бактерии рода *Yersinia* широко распространены в окружающей среде, они часто обнаруживаются в морской воде и гидро-

бионтах [3, 4, 8, 13]. Однако экология этих микроорганизмов в морской среде изучена недостаточно. Значительную роль в морях и океанах играют диатомовые водоросли. В настоящей работе приведены данные о взаимодействии *Y. pseudotuberculosis* с морскими диатомовыми водорослями.

Установлено, что в условиях гипертонической среды Гольдберга клетки *Y. pseudotuberculosis* уже в первые часы претерпевали характерные изменения, которые проявлялись в уплотнении цитоплазмы, образовании четко выраженной зоны нуклеоида, появлении вакуолей и плотных включений.

Характер взаимодействия *Y. pseudotuberculosis*, вирулентных для человека и животных, с морскими одноклеточными водорослями и его исход зависели от строения микроводорослей, в частности от наличия у них защитных оболочек.

Бактерии уже в первые часы после попадания в систему с микроводорослями контактировали с ними, реализуя адгезивный и токсический потенциал. Способность *Y. pseudotuberculosis* к адгезии указывает на наличие соответствующих лигандов на поверхности клеток микроводорослей, обеспечивающих этот процесс. При контакте бактерий с клетками *D. salina* и *P. prolonga* *Y. pseudotuberculosis* вызывали их разрушение. В противоположность этому, при взаимодействии *Y. pseudotuberculosis* с *P. cruentum* и *Platymonas* spp. клетки водорослей не повреждались. Одним из факторов, определяющих характер взаимодействия, по-видимому, является наличие или отсутствие у водорослей плотной оболочки, препятствующей образованию контактов бактерий с их наружной клеточной мембраной.

Постоянно присутствующая полисахаридная оболочка либо желеобразная полисахаридная капсула у красных микроводорослей *P. cruentum*, вырабатываемая в ответ на неблагоприятные внешние воздействия, делает их клетки не восприимчивыми к действию *Y. pseudotuberculosis* [12, 14, 15].

Таким образом, отмеченные нами особенности взаимодействия *Y. pseudotuberculosis* с морскими микроводорослями и его исход в значительной степени зависят от вида водорослей, их структурной организации. Выявленные факты указывают на возможность использования бактериями клеток некоторых видов микроводорослей как источника органических веществ в целях сохранения своей жизнеспособности в морских экосистемах. Новые знания, полученные в настоящем исследовании, расширяют имеющиеся представления об экологии *Y. pseudotuberculosis*, возбудителя острого инфекционного заболевания человека и теплокровных животных.

Литература

1. Водоросли / Вассер С.П., Кондратьева Н.В., Масюк Н.П. и др. Киев: Наукова думка, 1989. 608 с.
2. Диденко Л.В., Константинова Н.Д., Солохина Л.В. и др. Ультраструктура *Yersinia pseudotuberculosis* в процессе об-

ратимого перехода в покоящееся (некультивируемое) состояние в ассоциации с сине-зелеными водорослями // Журн. микробиол. 2002. №1. С. 17–23.

3. Кузнецов В.Г., Багрянцев В.Н. Экология иерсиний и иерсиниозы // Окружающая среда и здоровье населения Владивостока. Владивосток: Дальнаука, 1998. С. 154–164.
4. Кузнецов В.Г., Лаженцева Л.Ю., Елисейкина М.Г. и др. Распространение бактерий рода *Yersinia* в морской воде и гидробионтах // Журнал микробиологии. 2006. № 3. С. 117–120.
5. Масюк Н.П. Морфология, систематика, экология, географическое распространение рода *Dunaliella*. Киев: Наукова думка, 1973. 241 с.
6. Миронов А.А., Комиссарчик Я.Ю., Миронов В.А. Методы электронной микроскопии в биологии и медицине. Спб.-М.: Наука, 1994. 400 с.
7. Пушкарева В.И., Емельяненко Б.И., Диденко Л.В. и др. Покоящиеся формы *Yersinia pseudotuberculosis* при взаимодействии с зелеными водорослями и их экзометаболическими (популяционная динамика и ультраструктура) // Журн. микробиол. 1998. № 5. С. 9–13.
8. Сомов Г.П., Покровский В.И., Беседнова Н.Н., Антоненко Ф.Ф. Псевдотуберкулез. М.: Медицина, 2001. 254 с.
9. Терехова В.Е. Микробиологические аспекты экологии *Listeria monocytogenes* в морской среде: автореф. дис. ... канд. мед. наук. Владивосток, 2003. 24 с.
10. Тимченко Н.Ф., Недашковская Е.П., Долматова Л.С., Сомова-Исачкова Л.М. Токсины *Yersinia pseudotuberculosis*. Владивосток: Примполиграфкомбинат, 2004. 220 с.
11. *Algal Culturing Techniques* / Ed.: R. Andersen. NY: Elsevier, 2005. 565 p.
12. Gantt E., Conti S.F. The ultrastructure of *Porphyridium cruentum* // J. Cell. Biol. - 1965. No. 16. P. 365–381.
13. Falcao D.P., Correa E.F., Falkao G.P. *Yersinia* spp. in the environment: epidemiology and virulence characteristics // Adv. Exp. Med. Biol. 2003. Vol. 529. P. 341–343.
14. Percival E. Extracellular polysaccharides of microscopic Red Alga *Porphyridium cruentum* and *Porphyridium aerugineum* // J. Phycology. 1977. No. 13. P. 53–60.
15. Speer H., Dougherty W., Jones R. Studies of the fine structure of the red alga *Porphyridium cruentum* // J. Ultrastructure Res. 1964. No. 11. P. 84–89.

Поступила в редакцию 11.02.2010.

INTERACTION OF YERSINIA PSEUDOTUBERCULOSIS AND MARINE UNICELLULAR ALGAE

N.F. Timchenko¹, M.G. Eliseikina², N.A. Aizdaicher²

¹ Research Institute of Epidemiology and Microbiology, SB RAMS (1 Selskaya St. Vladivostok 690087 Russia), ² Institute of Marine Biology named after A.V. Zhirmundsky, FEB RAS (17 Palchevskogo St. Vladivostok 690041 Russia)

Summary – Via transmission electronic microscopy, the authors show dynamic features of interaction between human and warm-blood animal-virulent *Yersinia pseudotuberculosis* serovars I and III and marine unicellular algae *Plagioselmis prolonga* Butch. (Cryptophyta), *Porphyridium cruentum* Naeg. (Rhodophyta), *Platymonas* spp. (Chlorophyta), and *Dunaliella salina* Teod. (Chlorophyta). The bacteria and algae have interacted in experiment, and the results considerably depended on the structural morphology of microalgal cells, including available cyst. When the bacteria contacted with *D. salina* and *P. prolonga* with no outer cyst, *Y. pseudotuberculosis* induced cell lysis and destruction. When contacting with other microalgae species, *Y. pseudotuberculosis* appealed to the pathogenicity and adhesive and toxic effects. When contacting with *P. cruentum* and *Platymonas* spp. with outer cyst, the cells were being destructed.

Key words: *Yersinia pseudotuberculosis*, marine unicellular algae, interaction, electronic microscopy.