

Иммунофенотипирование субпопуляционного состава клеток крови экспериментальных животных, инфицированных *Y. pestis* с разным плазмидным составом

В.В. Войткова, В.И. Дубровина (dubrovina-valya@mail.ru), К.М. Корытов, Г.Б. Мухтургин, С.А. Витязева, С.В. Балахонов

ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора, (adm@chumin.irkutsk.ru)

Резюме

Представлены материалы по изучению субпопуляционного состава клеток крови экспериментальных животных, инфицированных *Y. pestis* с разным плазмидным составом. Установлено, что степень выраженности иммунологической перестройки макроорганизма при экспериментальной чумной инфекции зависит от плазмидного профиля исследованных штаммов. Полученные результаты могут свидетельствовать о том, что селекционные штаммы *Y. pestis* subsp. *pestis* И-3479 и *Y. pestis* subsp. *pestis* И-3480 являются перспективными кандидатами в качестве вакцинных и требуют дальнейшего изучения.

Ключевые слова: *Yersinia pestis*, плазмиды, экспериментальные животные, вакцина

Immunophenotyping of Blood Cell Subpopulations from Experimental Animals Infected by *Yersinia Pestis* with Different Plasmid Composition

V.V. Voitkova, V.I. Dubrovina (dubrovina-valya@mail.ru), K.M. Korytov, G.B. Mukhturgin, S.A. Vityazeva, S.V. Balakhonov
Federal Budgetary Healthcare Facility «Irkutsk Anti plague Research Institute» of Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing, adm@chumin.irkutsk.ru

Abstract

Relevance. The vast majority of the virulence factors of *Yersinia pestis* is determined by genes of plasmid. The genome of the plague pathogen *Altai* subspecies *Y. pestis* subsp. *altaica* has three plasmids: pYV, pYP and pYT. Plasmids pYV *Yersinia* strains exhibit phenotypic traits, the effect of which is aimed at the suppression of the phagocytic activity of the cells of the immune system. Species-specific plasmid pYP determines synthesis bacteriocine (pestitin 1) and plasminogen activator, and plasmid pYT – murine toxin and a capsular antigen F1. Loss of one or more plasmids leads to a change of the pathogenic properties and a reduction or even total loss of the virulence of the pathogen, as well as affect the functional state organs of the immune system.

Goal. To reveal characteristics of subpopulations of blood cells of experimental animals infected with *Y. pestis* containing various plasmids

Materials and methods. The study was conducted on 370 white improved conventional mice with standard of content and weight (17 – 19 g). As objects of study used 7 strains of *Y. pestis* from the collection of the museum of living cultures of the Irkutsk Scientific Research Anti-Plague Institute: *Y. pestis* subsp. *altaica* I-2948/3, *Y. pestis* subsp. *altaica* I-2948, *Y. pestis* subsp. *altaica* I-2359, *Y. pestis* subsp. I-3560 *pestis*, *Y. pestis* subsp. I-3480 *pestis*, *Y. pestis* subsp. I-2638 *pestis*, *Y. pestis* subsp. *pestis* I-3479.

Results. Immunograms analysis showed that changes in the composition of blood cells in experimental animals depends on plasmids of the strain and time of observation. Importantly, the infectious process induced strains with a complete set of plasmids (*Y. pestis* subsp. *pestis* I-3560, *Y. pestis* subsp. *pestis* I-2638), is accompanied by significant changes in cell populations, as the causative agent of plague blocking barrier system key mechanisms innate immunity and prevents the formation of high-grade microorganism adaptive immunity.

Conclusions. Are established features of subpopulation structure of blood cells of white mice, infected with strains of the main and *Altai* subspecies and their isogene options which are associated with a plasmid profile of a plague microbe.

Strains of *Y. pestis* subsp. *pestis* of I-3479 and *Y. pestis* subsp. *pestis* of I-3480 can be recommended for further studying as perspective as vaccinal.

Key words: *Yersinia pestis*, plasmids, experimental animals, vaccine

Введение

Как известно, подавляющее большинство факторов вирулентности *Yersinia pestis* детерминировано плазмидными генами [1 – 4]. В геноме возбудителя чумы алтайского подвида *Y. pestis*

subsp. *Itaica* имеется три плазмиды: pYV, pYP и pYT. В частности, с наличием плазмиды pYV штаммы иерсиний проявляют фенотипические признаки, действие которых направлено на подавление фагоцитарной активности клеток иммунной систе-

мы. Видоспецифическая плазмида рУР детерминирует синтез бактериоцина (пестицин 1) и активатора плазминогена, а плазмида рУТ – мышинового токсина и капсульного антигена F1 [1, 4 – 7]. Для возбудителя, который циркулирует в Тувинском очаге, характерно наличие в геноме дополнительной плазмиды рTP33, предположительно ассоциированной с факторами адаптации к условиям почвенного биоценоза [8].

Утрата одной или нескольких плазмид приводит к изменению патогенных свойств и к снижению или даже полной утрате вирулентности возбудителя, а так же влияет на морфофункциональное состояния органов иммунной системы [5]. В связи с этим изучение особенностей субпопуляционного состава клеток крови экспериментальных животных, подвергнутых воздействию чумного микроба, позволит количественно охарактеризовать состояние клеточных популяций крови белых мышей.

Цель исследования – выявить особенности субпопуляционного состава клеток крови экспериментальных животных, инфицированных *Y. pestis* с разным плазмидным составом.

Материалы и методы

Исследование проводили на 370 конвенциональных улучшенных белых мышах (НПО «Вектор», г. Новосибирск), стандартных по условиям содержания и массе (17 – 19 г). В качестве объектов исследования использовали 7 штаммов чумного микроба из коллекции музея живых культур Иркутского научно-исследовательского противочумного института (табл. 1).

Подопытным животным подкожно вводили взвеси штаммов чумного микроба в дозе

10^6 м.к./0,5 мл забуференного физиологического раствора (ЗФР). Контролем служили белые мыши, получившие ЗФР в объеме 0,2 мл. Работу с животными проводили в соответствии с «Правилами лабораторной практики», утвержденными Приказом Минздрава России № 708н от 23.08.2010 г. и с соблюдением СП 1.3.3118-13 «Безопасность работы с микроорганизмами I – II групп патогенности (опасности)». Учет результатов осуществляли на 3-и, 7-е, 14-е и 21-е сутки. В связи с тем, что мыши, зараженные высоковирулентными штаммами чумы (см. табл. 1), гибнут через 2 – 3 суток, кровь от этих животных забирали на 1-е, 2-е и 3-и сутки. Обеззараживания материала проводили с использованием формальдегида в конечной 2% концентрации [10].

Фенотип клеток крови мышей определяли методом пятипараметрического фенотипирования с использованием реагентов фирмы Becton Dickinson (США): CD45-PE-Cy5, CD3-FITC, CD4-Alexa-700, CD8-APC-Cy7, CD19-PE-Cy7. Анализ окрашенных образцов проводили на проточном цитофлуориметре BD FACS Canto™ II (Becton Dickinson, США) в программе BD Diva версии 6.0. В каждой пробе анализировалось 10 000 событий клеток CD45+, которые выделяли на графике SSC/CD45. Оценивали абсолютное содержание лейкоцитов (10^9 /л) и относительное содержание (%) основных популяций: гранулоцитов, лимфоцитов и моноцитов. В лимфоцитарном гейте определяли общее содержание Т-лимфоцитов (CD3+), Т-хелперов (CD3+ CD4+) и цитотоксических Т-лимфоцитов (CD3+ CD8+), В-лимфоцитов (CD3- CD19+).

Статистическая обработка данных осуществлялась при помощи стандартного пакета прикладных программ Statistica, версия 6.1 (Copyright©StatSoft,

Таблица 1.
Характеристика штаммов чумного микроба

Штамм	Место выделения	Плазмидный состав	Вирулентность для белых мышей (LD_{50}), м.к./мл
<i>Y. pestis</i> subsp. <i>pestis</i> И-2638	Тувинский природный очаг чумы	рУР ⁺ рУУ ⁺ рУТ ⁺ рTP33 ⁺	10 высоковирулентный
<i>Y. pestis</i> subsp. <i>pestis</i> И-3479*	Иркутский противочумный институт	рУР ⁺ рУУ ⁺ рУТ ⁺ рTP33 ⁺	авирулентный
<i>Y. pestis</i> subsp. <i>pestis</i> И-3480*	Иркутский противочумный институт	рУР ⁺ рУУ ⁺ рУТ ⁺ рTP33 ⁺	авирулентный
<i>Y. pestis</i> subsp. <i>pestis</i> И-3560	Горно-Алтайский природный очаг чумы	рУР ⁺ рУУ ⁺ рУТ ⁺ рTP33 ⁺	4 высоковирулентный
<i>Y. pestis</i> subsp. <i>altaica</i> И-2359	Горно-Алтайский природный очаг чумы	рУР ⁺ рУУ ⁺ рУТ ⁺ рTP33 ⁺	4×10^4 слабовирулентный
<i>Y. pestis</i> subsp. <i>altaica</i> И-2948	Горно-Алтайский природный очаг чумы	рУР ⁺ рУУ ⁺ рУТ ⁺ рTP33 ⁺	7×10^2 слабовирулентный
<i>Y. pestis</i> subsp. <i>altaica</i> И-2948/3**	Иркутский противочумный институт	рУР ⁺ рУУ ⁺ рУТ ⁺ рTP33 ⁺	авирулентный

Примечание: *штаммы селекционированы из штамма *Y. pestis* subsp. *pestis* И-2638;
**штамм селекционирован из атипичного штамма *Y. pestis* subsp. *altaica* И-2948

Таблица 2.

Показатели содержания популяций лейкоцитов у мышей, зараженных штаммами *Y. pestis* с разным плазмидным составом (Mean $\pm$ SD)

Штамм	Сутки	Гранулоциты		Лимфоциты		Моноциты	
		10 ⁹ кл/мл	%	10 ⁹ кл/мл	%	10 ⁹ кл/мл	%
Контроль		3,90 $\pm$ 0,96	61,52 $\pm$ 5,07	2,31 $\pm$ 0,49	37,80 $\pm$ 4,33	0,04 $\pm$ 0,01	1,22 $\pm$ 0,49
<i>Y. pestis</i> subsp. <i>pestis</i> И-2638	1	5,84 $\pm$ 0,95*	70,92 $\pm$ 9,60**	1,44 $\pm$ 0,17*	25,77 $\pm$ 9,62**	0,12 $\pm$ 0,04***	2,08 $\pm$ 0,51*
	2	6,12 $\pm$ 1,02***	76,36 $\pm$ 7,57***	1,57 $\pm$ 0,13**	17,66 $\pm$ 3,73***	0,34 $\pm$ 0,06***	4,19 $\pm$ 0,98***
	3	4,25 $\pm$ 0,42	70,72 $\pm$ 5,22**	1,40 $\pm$ 0,46**	25,02 $\pm$ 5,79**	0,10 $\pm$ 0,02***	1,86 $\pm$ 0,24*
<i>Y. pestis</i> subsp. <i>pestis</i> И-3560	1	7,28 $\pm$ 1,38**	76,16 $\pm$ 2,72**	1,70 $\pm$ 0,22*	20,35 $\pm$ 3,41**	0,14 $\pm$ 0,01***	2,02 $\pm$ 0,45*
	2	4,48 $\pm$ 0,92	71,75 $\pm$ 3,66***	0,87 $\pm$ 0,28*	19,01 $\pm$ 3,77***	0,31 $\pm$ 0,05***	6,92 $\pm$ 1,34***
	3	5,39 $\pm$ 1,09*	68,42 $\pm$ 5,76**	2,17 $\pm$ 0,27	28,13 $\pm$ 4,34**	0,18 $\pm$ 0,04**	2,69 $\pm$ 0,54**
<i>Y. pestis</i> subsp. <i>pestis</i> И-3479	3	4,03 $\pm$ 0,93	64,43 $\pm$ 5,87	1,94 $\pm$ 0,66	33,67 $\pm$ 6,28	0,07 $\pm$ 0,01*	2,23 $\pm$ 0,51***
	7	5,37 $\pm$ 1,27*	63,10 $\pm$ 2,94	2,67 $\pm$ 0,02	34,07 $\pm$ 3,92	0,21 $\pm$ 0,04**	2,21 $\pm$ 0,49**
	14	2,48 $\pm$ 0,86	58,62 $\pm$ 4,78	1,85 $\pm$ 0,53	37,76 $\pm$ 4,36	0,05 $\pm$ 0,03	0,50 $\pm$ 0,06**
	21	3,24 $\pm$ 0,79	60,11 $\pm$ 3,05	2,11 $\pm$ 0,66	39,07 $\pm$ 2,93	0,03 $\pm$ 0,01	1,03 $\pm$ 0,15
<i>Y. pestis</i> subsp. <i>pestis</i> И-3480	3	3,26 $\pm$ 0,80	62,72 $\pm$ 4,23	1,90 $\pm$ 0,33	33,62 $\pm$ 6,79	0,03 $\pm$ 0,01	3,24 $\pm$ 0,83***
	7	3,64 $\pm$ 0,65	59,64 $\pm$ 4,43	2,10 $\pm$ 0,69	35,68 $\pm$ 3,84	0,24 $\pm$ 0,12**	6,01 $\pm$ 2,23**
	14	3,10 $\pm$ 0,57	59,66 $\pm$ 4,95	1,65 $\pm$ 0,01	39,45 $\pm$ 4,99	0,09 $\pm$ 0,01***	1,04 $\pm$ 0,56
	21	3,03 $\pm$ 0,62	61,29 $\pm$ 3,29	1,59 $\pm$ 0,28	34,19 $\pm$ 4,22	0,03 $\pm$ 0,01	1,10 $\pm$ 0,25
<i>Y. pestis</i> subsp. <i>altaica</i> И-2359	3	3,55 $\pm$ 1,06	77,06 $\pm$ 4,15***	1,58 $\pm$ 0,62	19,14 $\pm$ 4,93***	0,15 $\pm$ 0,05*	4,16 $\pm$ 1,12**
	7	7,44 $\pm$ 1,50***	78,66 $\pm$ 7,24***	3,68 $\pm$ 0,43**	32,09 $\pm$ 9,10	0,39 $\pm$ 0,08*	4,64 $\pm$ 2,04*
	14	3,64 $\pm$ 1,05	61,66 $\pm$ 5,73	2,62 $\pm$ 0,90	37,7 $\pm$ 5,86	0,04 $\pm$ 0,01	0,66 $\pm$ 0,16
	21	3,19 $\pm$ 1,18	61,89 $\pm$ 4,23	2,50 $\pm$ 0,07	37,46 $\pm$ 4,14	0,03 $\pm$ 0,01	0,82 $\pm$ 0,17
<i>Y. pestis</i> subsp. <i>altaica</i> И-2948	3	10,04 $\pm$ 2,47***	77,75 $\pm$ 6,24***	2,91 $\pm$ 0,39	19,60 $\pm$ 3,24***	0,53 $\pm$ 0,13**	5,47 $\pm$ 2,12**
	7	5,10 $\pm$ 1,60*	68,89 $\pm$ 5,80*	2,42 $\pm$ 0,81	27,53 $\pm$ 6,27***	0,32 $\pm$ 0,02***	5,43 $\pm$ 0,77*
	14	3,72 $\pm$ 0,57	72,07 $\pm$ 3,04**	1,73 $\pm$ 0,34	26,83 $\pm$ 2,66***	0,04 $\pm$ 0,02	0,90 $\pm$ 0,27
	21	4,06 $\pm$ 0,60	60,53 $\pm$ 1,59	2,35 $\pm$ 0,68	38,40 $\pm$ 1,85	0,03 $\pm$ 0,01	1,24 $\pm$ 0,17
<i>Y. pestis</i> subsp. <i>altaica</i> И-2948/3	3	3,54 $\pm$ 0,83	63,78 $\pm$ 5,21	2,10 $\pm$ 0,68	33,71 $\pm$ 6,27	0,12 $\pm$ ***	2,31 $\pm$ 0,86***
	7	4,06 $\pm$ 1,63	67,93 $\pm$ 4,68	1,66 $\pm$ 0,90	32,15 $\pm$ 3,73	0,11 $\pm$ 0,02***	5,15 $\pm$ 0,83***
	14	4,09 $\pm$ 0,95	63,05 $\pm$ 2,46	1,95 $\pm$ 0,53	35,93 $\pm$ 2,28	0,02 $\pm$ 0,01	1,12 $\pm$ 0,41
	21	2,53 $\pm$ 0,28	64,08 $\pm$ 4,01	1,57 $\pm$ 0,44	34,30 $\pm$ 4,82	0,04 $\pm$ 0,01	1,06 $\pm$ 0,35

Примечание: *P < 0,05, **P < 0,01, ***P < 0,001 по сравнению с контролем.

Inc 19842001, ИПЧИ 31415926535897) с использованием дисперсионного анализа ANOVA и критерия корреляции Пирсона (r). Данные представлены в виде среднего арифметического (Mean) $\pm$ среднее квадратичное отклонение (SD). Различия считали достоверными при уровне значимости P < 0,05.

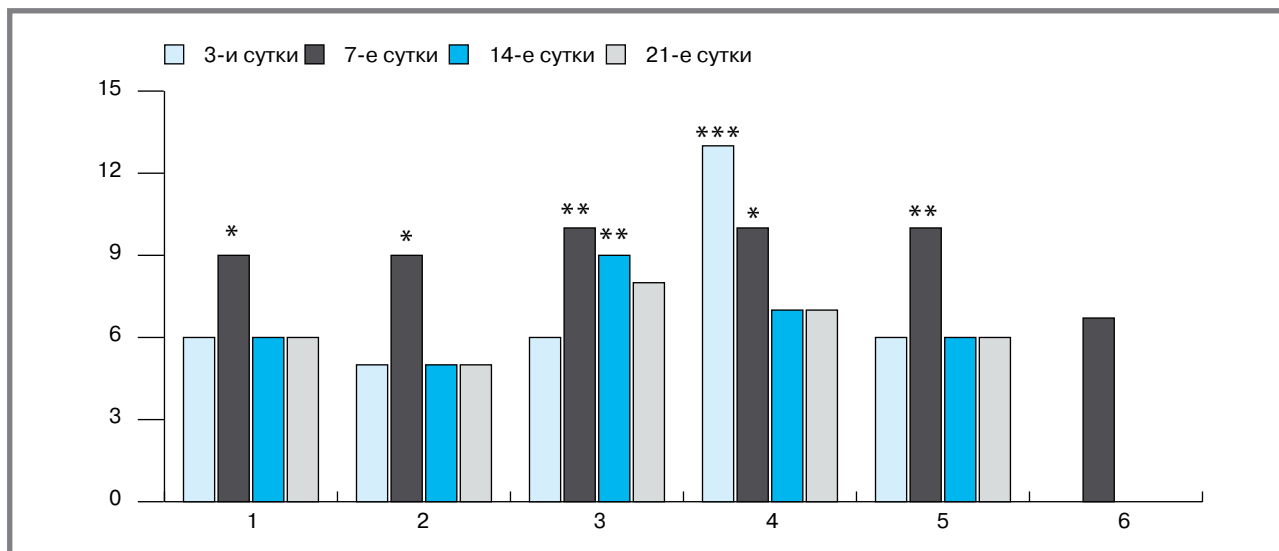
Результаты и обсуждение

При анализе иммунограмм установлено, что изменение состава клеток крови экспериментальных животных зависит от плазмидного состава штамма и сроков наблюдения (табл. 2). Так,

у экспериментальных животных, зараженных слабо- и авирулентными штаммами *Y. pestis* с разным плазмидным составом, показатели абсолютного содержания лейкоцитов повышались преимущественно на 7-е сутки наблюдения, что указывает на пик развития инфекционного процесса (рис. 1). Наибольший эффект оказывал атипичный штамм *Y. pestis* subsp. *altaica* И-2948, что на 3-и сутки выражалось резким увеличением количества лейкоцитов – в 2 раза по сравнению с контролем и на 11% по сравнению с физиологической нормой (лейкоциты от 5,1 до 11,6 $\times 10^9$ кл/л). Вы-

Рисунок 1.

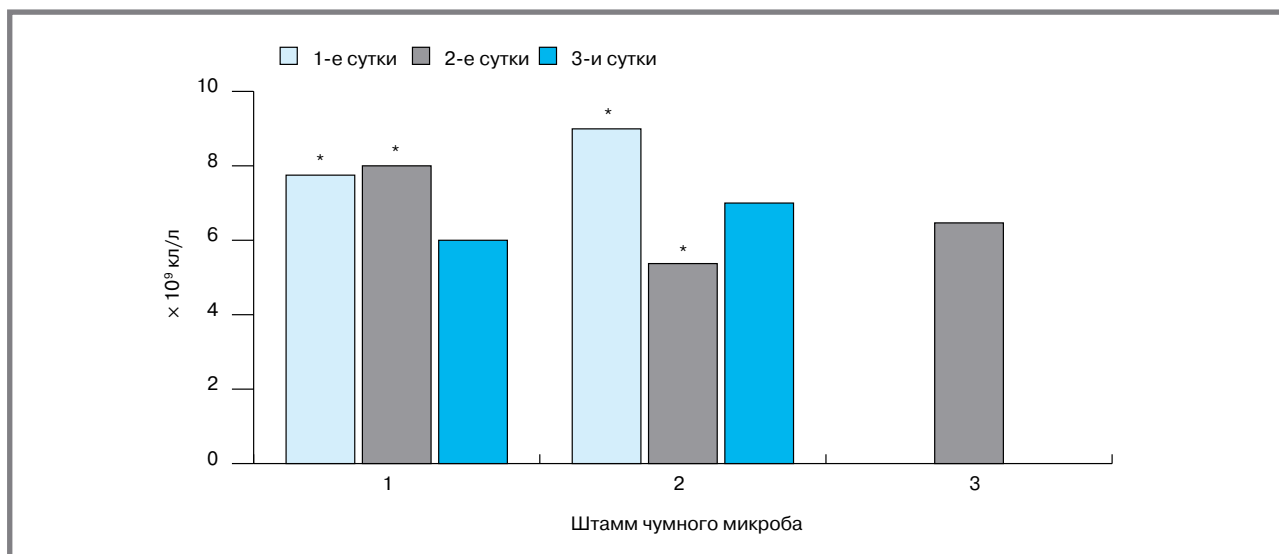
Абсолютное содержание лейкоцитов в крови у экспериментальных животных, зараженных слабо- и авирулентными штаммами *Y. pestis* с разным плазмидным составом



Примечание: * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$ по сравнению с контролем; 1 – *Y. pestis* subsp. *pestis* И-3479; 2 – *Y. pestis* subsp. *pestis* И-3480; 3 *Y. pestis* subsp. *altaica* И-2359; 4 *Y. pestis* subsp. *altaica* И-2948; 5 *Y. pestis* subsp. *altaica* И-2948/3; 6 – контроль

Рисунок 2.

Абсолютное содержание лейкоцитов в крови у экспериментальных животных, зараженных высоковирулентными штаммами *Y. pestis*



Примечание: 1 – *Y. pestis* subsp. *pestis* И-2638; 2 – *Y. pestis* subsp. *pestis* И-3560; 3 – контроль. * $P < 0,01$ по сравнению с контролем

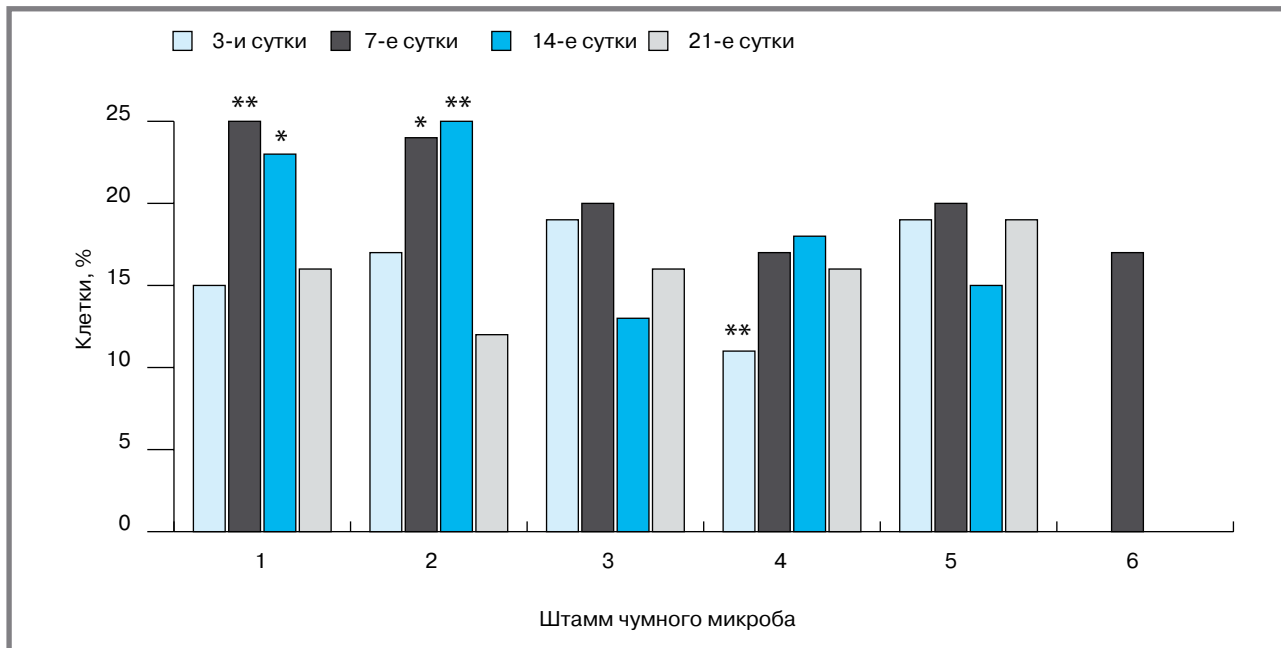
явлено повышение количественных показателей моноцитов у всех экспериментальных животных, в то время как изменение процентного содержания гранулоцитов было отмечено только в случае введения мышам штаммов алтайского подвида *Y. pestis* subsp. *altaica* И-2359 и *Y. pestis* subsp. *altaica* И-2948. Кроме того, у белых мышей, зараженных *Y. pestis* subsp. *altaica* И-2948, регистрировалась относительная лимфопения при нормально уровне общего количества лимфоцитов в крови, обусловленная увеличением числа гранулоцитов.

У животных, зараженных высоковирулентными штаммами основного подвида *Y. pestis* subsp. *pestis* И-2638 и *Y. pestis* subsp. *pestis* И-3560 реги-

стрировался лейкоцитоз (рис. 2). Обращает внимание резкий переход абсолютного гранулоцитоза в лейкопению у мышей, зараженных *Y. pestis* subsp. *pestis* И-3560, что является крайне неблагоприятным признаком и свидетельствует о тяжелой форме инфекционного процесса. Лейкопения в сочетании с лимфопенией в случае инфицирования животных культурой *Y. pestis* subsp. *pestis* И-3560 является признаком иммуносупрессии. Следует отметить, что истинная (абсолютная) лимфопения, наблюдающаяся в начальной стадии острых инфекционно-токсических и тяжелых септических процессов, регистрировалась только у мышей, зараженных штаммами *Y. pestis* с полным набором плазмид (табл. 1).

Рисунок 3.

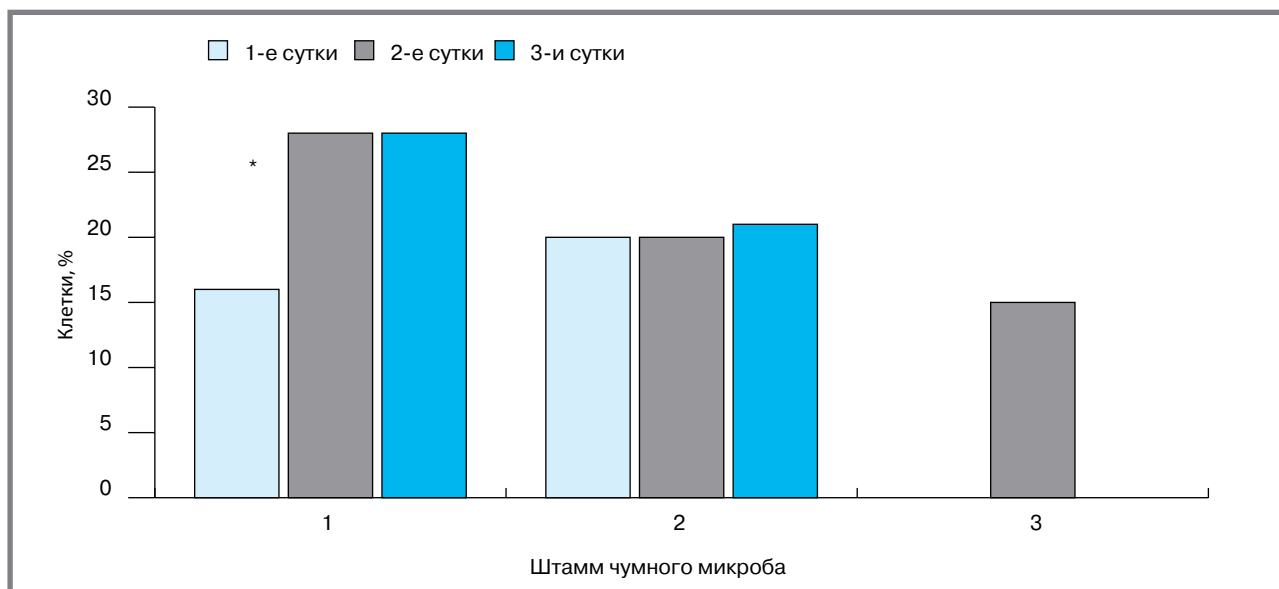
Процентное содержание В-лимфоцитов в крови у экспериментальных животных в динамике экспериментальной чумной инфекции, вызванной *Y. pestis* с разным плазмидным составом



Примечание: * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$ по сравнению с контролем 1 – *Y. pestis* subsp. *pestis* И-3479; 2 – *Y. pestis* subsp. *pestis* И-3480; 3 *Y. pestis* subsp. *altaica* И-2359; 4 *Y. pestis* subsp. *altaica* И-2948; 5 *Y. pestis* subsp. *altaica* И-2948/3; 6 – контроль

Рисунок 4.

Абсолютное содержание В-лимфоцитов в крови у экспериментальных животных, зараженных высоковирулентными штаммами *Y. pestis*



Примечание: * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ по сравнению с контролем. 1 – *Y. pestis* subsp. *pestis* И-2638; 2 – *Y. pestis* subsp. *pestis* И-3560; 3 – контроль

Известно, что содержание Т-лимфоцитов является наиболее информативным показателем при оценке воспалительной реакции организма. Так, у мышей, зараженных *Y. pestis* subsp. *pestis* И-2638 и *Y. pestis* subsp. *pestis* И-3560, выявлено снижение общего содержания Т-лимфоцитов на 2 – 3-и сутки и Т-хелперов на 2-е сутки наблюдения в среднем в 1,3 и 1,6 раза по сравнению с контролем ($62,52 \pm 8,49$ и $43,07 \pm 6,18\%$) соответ-

ственно. Данное обстоятельство может указывать на слабую активацию клеточного звена иммунитета, поскольку иммунологическая перестройка организма на введение экспериментальным животным культуры этих штаммов не успевает развиваться. Подтверждением этому также служит снижение количества CD3+CD8+-клеток в среднем на 1,4 раза по сравнению с контрольной группой животных ($12,13 \pm 1,11\%$). После введения белым

мышам *Y. pestis* subsp. *pestis* И-3560 (2-е сутки) и *Y. pestis* subsp. *altaica* И-2948 (7-е сутки) достоверное снижение содержания Т-хелперов сопровождалось уменьшением соотношения CD4/CD8 в 1,3 раза по сравнению с контролем. Следует отметить, что снижение уровня Т-лимфоцитов в опытной группе животных, зараженных *Y. pestis* subsp. *pestis* И-3479 выявлено только на 3-и сутки ($48,58 \pm 5,07\%$, $P < 0,01$) по сравнению с контролем.

При оценке субпопуляционного состава лимфоцитов крови у мышей, зараженных всеми исследованными штаммами, только в случае введения животным культур селекционных штаммов *Y. pestis* subsp. *pestis* И-3479 (pYV) и *Y. pestis* subsp. *pestis* И-3480 (pYP pYV) на 7-е и 14-е сутки установлено увеличение процента CD3-CD19+-клеток (рис. 3). В случае применения в качестве инфекционного агента штаммов основного подвида *Y. pestis* subsp. *pestis* И-2638 и *Y. pestis* subsp. *pestis* И-3560, имеющих полный набор плазмид, повышение содержания CD3-CD19+-клеток выявлено на 2 – 3-и сутки (рис. 4).

Анализ взаимосвязи клеточного состава крови и плазмидного профиля чумного микроба показал, что на ранних сроках инфекционного процесса повышение содержания гранулоцитов ($r = -0,66$, $P = 0,027$), а также снижение числа лимфоцитов ($r = 0,71$, $P = 0,014$) связано с наличием плазмиды pYV. Отсутствие изменений количества лимфоцитов у мышей, инфицированных изогенными штаммами *Y. pestis* subsp. *pestis* И-3480 (pYPpYV pYT*TP33+) и *Y. pestis* subsp. *altaica* И-2948/3 (pYPpYV pYT*TP33+), а также атипичным штаммом *Y. pestis* subsp. *altaica* И-2948 (pYPpYV pYT*TP33+), может быть связано с отсутствием плазмиды pYP ($r = 0,74$, $P = 0,009$). Кроме того, штаммы, лишенные данной плазмиды, не оказывали статистически значимого влияния на снижение популяции Т-лимфоцитов ($r = 0,68$, $P = 0,021$). Следует отметить, что содер-

жание В-лимфоцитов в крови белых мышей при экспериментальной чумной инфекции не зависило от плазмидного состава штаммов *Y. pestis*.

Таким образом, полученные в ходе исследования данные подтверждают ранее полученные результаты изучения действия чумного микроба с разным набором плазмид на клеточный состав перитонеальной жидкости белых мышей [11]. Важно отметить, что инфекционный процесс, вызванный штаммами с полным набором плазмид (*Y. pestis* subsp. *pestis* И-3560, *Y. pestis* subsp. *pestis* И-2638), сопровождается существенными изменениями клеточных популяций, так как возбудитель чумы блокирует ключевые барьерные механизмы системы врожденного иммунитета и препятствует формированию макроорганизмом полноценного адаптивного иммунитета. В случае мышей, зараженных *Y. pestis* subsp. *pestis* И-3560, неблагоприятным прогностическим признаком может рассматриваться сочетание лейко- и лимфопении, что возможно связано с высокой вирулентностью данного штамма ($LD_{50} = 4$ м.к.). Повышение числа В-лимфоцитов у экспериментальных животных, которым были введены селекционные штаммы *Y. pestis* subsp. *pestis* И-3479 и *Y. pestis* subsp. *pestis* И-3480, на 7 – 14-е сутки может свидетельствовать об активации пролиферации лимфоцитов.

Выводы

1. Выявлены особенности субпопуляционного состава клеток крови белых мышей, инфицированных штаммами основного и алтайского подвидов и их изогенных вариантов, которые ассоциированы с плазмидным профилем чумного микроба.
2. Штаммы *Y. pestis* subsp. *pestis* И-3479 и *Y. pestis* subsp. *pestis* И-3480 могут быть рекомендованы для дальнейшего изучения как перспективные в качестве вакцинных.

Литература

1. Анисимов А.Н. Факторы *Y. pestis*, обеспечивающие циркуляцию и сохранение возбудителя чумы в экосистемах природных очагов. Сообщение 1. Молекулярная генетика, микробиол. и вирусол. 2002; 3: 3 – 23.
2. Дубровина В.И. Механизмы фагоцитоза и его роль при формировании резистентности организма к возбудителям чумы, псевдотуберкулеза и туляремии (экспериментальное исследование). Дис. ... д-ра. мед. наук. Иркутск; 2004: 261.
3. Бугоркова С.А., Девдарини З.Л., Шуковская Т.Н., Кутырев В.В. Исторические и современные представления о проблеме специфической профилактики чумы. Probl. особо опасных инф. 2013; 3: 63 – 69.
4. Дубровина В.И., Коновалова Ж.А., Витязева С.А., Марков Е.Ю., Балахонов С.В., Загоскина Т.Ю. Чума: вопросы патогенеза и иммуногенеза. Иркутск: Иркутский научный центр хирургии и травматологии; 2016: 56.
5. Бывалов А.А., Кутырев В.В. Современное состояние проблемы совершенствования средств вакцинопрофилактики чумы. Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 2011; 2: 97 – 104.
6. Витязева С.А., Балахонов С.В., Дубровина В.И., Марков Е.Ю., Половинкина В.С. Актуальные вопросы совершенствования специфической профилактики чумы и сибирской язвы. Эпидемиология и Вакцинопрофилактика. 2013; 4: 63 – 66.
7. Марков Е. Ю., Половинкина В.С. Структура и иммуноадьювантные свойства CpG–ДНК. Медицинская иммунология. 2010; 12(6): 469 – 476.
8. Нактинис В.И., Малеева Н.Е., Санько Д.Ф. Два простых метода выделения ДНК из различных источников с применением цетавлона. Биохимия. 1977; 42 (10): 1783 – 1789.
9. Николаев В.Б., Иванова Т.А., Половинкина В.С., Саппо С.Г., Попова Ю.О., Марков Е.Ю., Голубинский Е.П. Способ получения иммуногенного препарата из *Yersinia pestis* EV. Патент РФ № 2248217; 2003.
10. Войткова В.В., Дубровина В.И., Иванова Т.А., Мухтургин Г.Б., Корытов К.М., Балахонов С.В. Обеззараживание образцов крови, содержащих *Yersinia pestis*, для проведения цитофлуориметрических исследований: методические рекомендации. Иркутск: Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора; 2015: 14.
11. Мухтургин Г.Б., Витязева С.А., Войткова В.В. Клеточный состав перитонеальной жидкости белых мышей, инфицированных *Yersinia pestis* с разным плазмидным составом. Инфекция и иммунитет. 2014; 4(1): 80.

References

1. Anisimov A.P. *Yersinia pestis* factors, assuring circulation and maintenance of the plague pathogen in natural foci ecosystems. Report 1. Molekulyarnaya genetika, mikrobiologiya i virusologiya. [Molecular Genetics, Microbiol. and Virol.]. 2002; 3: 3 – 23. (in Russian).
2. Dubrovina V.I. Phagocytosis mechanisms and its role in resistance formation to *Yersinia pestis*, *Yersinia pseudotuberculosis* and *Francisella tularensis* (experimental studying): Thesis ... Doctor of Med. Sci. Irkutsk, 2004: 261 (in Russian).
3. Bugorkova S.A., Devdariani Z.L., Shchukovskaya T.N., Kuttyrev V.V. Historical and modern views on the problem of specific plague prophylaxis. Problemy osobo opasnykh infekcij [Problems of especially dangerous infections]. 2013; 3: 63 – 69 (in Russian).
4. Dubrovina V.I., Konovalova Z.A., Vityazeva S.A., Markov E.Yu., Balakhonov S.V., Zagorskina T.Yu. Plague: questions of pathogenesis and immunogenesis. Irkutsk; 2016: 56 (in Russian).
5. Byvalov A.A., Kuttyrev V.V. Current state of problem of improving tools for plague vaccine prophylaxis. Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii [Zh. microbiology, epidemiology and immunobiology]. 2011; 2: 97 – 104 (in Russian).
6. Vityazeva S.A., Balakhonov S.V., Dubrovina V.I., Markov E.Yu., Polovinkina V.S. Actual problems of plague and anthrax prevention improvement. Epidemiology & Vaccinoprofilaktika. Epidemiology & Vaccinal Prevention. 2013; 4: 63 – 66 (in Russian).
7. Markov E.Yu., Polovinkina V.S. Structure and immunoadjuvant properties of CpG-DNA. Medicinskaja immunologija [Meditsinskaya immunologia]. 2010; 12 (6): 469 – 476 (in Russian).
8. Naktinis V.I., Maleeva N.E., San'ko D.F. Two simple methods for DNA extraction from various sources using cetavlon. Biokhimiya [Biochemistry]. 1977; 42 (10): 1783 – 1789 (in Russian).
9. Nikolaev V.B., Ivanova T.A., Polovinkina V.S., Sappo S.G., Popova Ju.O., Markov E.Ju., Golubinskij E.P. Method for preparing immunogenic preparation from *Yersinia pestis* EV. Patent RF, N 2248217; 2003 (in Russian).
10. Voikova V.V., Dubrovina V.I., Ivanova T.A., Mukhturgin G.B., Korytov K.M., Balakhonov S.V. Disinfection of blood samples containing *Yersinia pestis* for flow cytometric studies: Methodical recommendations. Irkutsk: Irkutsk Anti plague Research Institute of Siberia and Far East; 2015: 14 (in Russian).
11. Mukhturgin G.B., Vityazeva S.A., Voikova V.V. Cellular composition of peritoneal fluid white mice infected with *Yersinia pestis* with different plasmid composition. Infekcija i immunitet [Infection and immunity]. 2014; 4 (1): 80.

КОРОТКОЙ СТРОКОЙ

Ученые переписывают геном кишечной палочки

Биологи из Гарварда, Массачусетского технологического института и нескольких других американских институтов представили планы работы над полногеномной заменой генетического кода кишечной палочки, что в перспективе позволит создать искусственную бактерию, неспособную размножаться вне пределов лаборатории.

Исходя из того, что каждые три нуклеотида (кодон) кодируют одну и ту же аминокислоту, ученые решили заменить некоторые (преимущественно редкие) кодоны их синонимами, причем сделать это во всем геноме полноценной бактерии. При достаточно большом количестве выкинутых кодонов (по крайней мере более трех) она, например, была бы полностью устойчива к любым существующим вирусам, поскольку вирусная генетическая информация в ней стала бы просто «нечитаема». Соответственно и получать полезную, но не «адаптированную», генетическую информацию из внешней среды (гены устойчивости к антибиотикам и т. д.) она бы не могла, что важно для биотехнологического применения. Кроме того, в белки такой бактерии можно вводить искусственные, не встречающиеся в природе аминокислоты и химические группы, например, для синтеза каких-то новых лекарств или промышленных веществ. Причем делать это можно стандартными молекулярно-биологическими методами, не разрабатывая новые.

Сложность создания такой бактерии заключается в том, что нужно заменить выбранные триплеты ДНК во всем геноме и сделать это не для одного гена, а для всего генома. Ранее подобные работы по замене кодонов уже проводились, но масштаб их был существенно меньше. Когда речь идет о замене семи кодонов во всем геноме, как это запланировано в настоящей работе, это не только требует введения очень большого числа изменений (148 955 нуклеотидных замен), но и грозит

возникновением разнообразных непредвиденных негативных эффектов, которых при работе только со стоп-кодонами не бывает.

Ученые отобрали семь достаточно редких кодонов, которые можно было бы удалить вместе с распознающей их тРНК. Затем авторы создали программу, которая позволяет на основе известной последовательности генома (использовалась уже минимизированная, «очищенная» версия генома кишечной палочки) заменить выкидываемые кодоны на их синонимы.

При выборе замены учитывалось множество факторов, которые потенциально могут повлиять на жизнеспособность организма: ученые старались предсказать и максимально сохранить важные свойства исходной ДНК. Например, программой корректировалась доля GC-нуклеотидов (она влияет на механическую жесткость ДНК и многое другое), сохранялись сайты прикрепления рибосом и те места в матричной РНК, где она образует вторичную структуру.

В результате программа выдавала несколько тысяч отредактированных фрагментов, которые уже синтезировали химическим способом в цепочки длиной 2 – 4 тыс. оснований.

В итоге на момент публикации ученые проверили работоспособность 63% синтетического генома (он получил название *rE. coli-57*), причем 91% проверенных генов сохранил свою работоспособность. Однако работа над синтетическим геномом на этом еще не закончена (возможно, из-за финансовых трудностей). Общую стоимость проекта авторы оценивают в один миллион долларов.

Информацию предоставил Н.И. БРИКО

Источник: Nili Ostrov et al. Design, synthesis, and testing toward a 57-codon genome. Science, 2016; DOI: 10.1126/science.aaf3639