

4. Romanenko T.A., Bilomerya T.A. Immunological structure to pertussis in Donetsk region. Infectious diseases. 2011; 3 (65): 45 – 47 (in Ukraine).
5. Grunicheva T., Babura E., Gorbatova Y. Effectiveness and peculiarities of immunoprophylaxis of pertussis among children and teenagers in Kaliningrad oblast', Russia. EpiNorth. 2010; 13 (2): 40 – 43.
6. On approval of the National Programme of Immunization and protection from infectious diseases in 2009 – 2015. The Law of Ukraine of 21.10.2009. № 1658-VI. Kyiv; 2009 (in Ukraine).
7. Health for all in the 21st century. Document WHA 51/5. Geneva: World Health Organization; 1998.
8. Romanenko T.A. Systematic analysis of the current epidemic process of pertussis and improvement of epidemiological care: PhD of med. sci. diss. Kyiv; 2012: 36 (in Ukraine).
9. Libanova E.M., Makarova O.V., Kurilo I.O., Novikov B.M., Tkachenko L.G., Ringach N.O. et al. Human development in Ukraine: social and demographic factors of modernization of national economy (collective monograph). Kyiv: Institute of demography and social research of the name M.V. Ptukha of NAN of Ukraine; 2012: 320 (in Ukraine).
10. Regional human development: statistical bulletin. Kyiv: Government service of statistics of Ukraine; 2011: 43 (in Ukraine).
11. Ilyina S.V. Influence of technogenic environmental pollution on efficiency of vaccinal prevention at in children's population: PhD of med. sci. diss. Irkutsk; 2008: 39 (in Russian).
12. Lang T.A., Sesik M. How to describe statistics in medicine: Annotated guide instructions for authors, editors and reviewers. Moscow: Practical medicine; 2011: 480 (in Russian).
13. Savilov E.D., Astafyev V.A., Zhdanova S.N., Zarudnev E.A. The Epidemiology analysis: Methods of statistical processing of the material; Novosibirsk: Nauka-Centr; 2011: 156 (in Russian).
14. Khodak L.A., Navet T.I., Podavalenko A.P., Porosha N.S. Modern aspects of clinical presentation, diagnosis and treatment of pertussis in children: Methodological recommendations. Kharkiv: Stil'; 2014: 32 (in Ukraine).

Сравнительная оценка протеолитической и супероксиддисмутазной активности *Yersinia pestis* с разным плазмидным составом

О.В. Юрьева (olga.yur1963@gmail.com), В.И. Дубровина, Г.Б. Мухтургин, Т.А. Иванова, К.М. Корытов, Е.Г. Токмакова, С.В. Балахонов

ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора

Резюме

В работе представлены данные о супероксиддисмутазной и протеолитической активности штаммов *Yersinia pestis* с разным плазмидным спектром. Установлено, что супероксиддисмутазная активность изученных штаммов *Y. pestis* не связана с плазмидным составом. В отношении протеолитической активности выявлены некоторые различия. Обнаружена прямая зависимость степени протеолитической активности исследованных штаммов чумного микроба от наличия в их геноме плазмиды pYV.

Ключевые слова: *Yersinia pestis*, супероксиддисмутаза, протеолитические ферменты

Comparative Evaluation of Proteolytic and Superoxide Dismutase Activities of *Yersinia pestis* Strains with Different Plasmid Composition

O.V. Yur'eva (olga.yur1963@gmail.com), V.I. Dubrovina, G.B. Mukhturgin, T.A. Ivanova, K.M. Korytov, E.G. Tokmakova, S.V. Balakhonov

Irkutsk Antiplague Research Institute of Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing

Abstract

Data of the proteolytic and superoxide dismutase activities of *Yersinia pestis* strains with different plasmid spectrum are presented. It was established that superoxide dismutase activity of the tested *Y. pestis* strains was not associated with its plasmid composition. Some differences were revealed concerning the proteolytic activity. Direct dependence of proteolytic activity level of the studied *Y. pestis* strains on pYV plasmid presence in its genome was found.

Key words: *Yersinia pestis*, superoxide dismutase, proteolytic enzymes

Введение

Важным условием патогенности и адаптивной пластичности микроорганизмов является их способность к противодействию иммунной системе макроорганизма. В последнее время существенно возрос интерес к факторам вирулентности, обуславливающим устойчивость патогенов к различным механизмам иммунитета. Сведения о мо-

лекулах, системах и органеллах патогенных микроорганизмов, позволяющих им противостоять врожденному и адаптивному иммунитету макроорганизма, могут послужить основой для разработки методов лечения и профилактики инфекционных заболеваний [1]. Ф.Ю. Гариб классифицировал основные приспособительные «стратегии» противодействия патогенов самой древней защитной

системе макроорганизма – врожденному иммунитету. К ним относятся: «ускользание» бактерий от иммунного распознавания, препятствование захвату фагоцитирующими клетками и устойчивость к их системам «киллинга» (низкая рН, синтез токсичных радикалов кислорода и азота, продукция антимикробных пептидов, дефицит железа и пр.).

Возбудители особо опасных инфекций, безусловно, являются наиболее приоритетным объектом для изучения факторов противодействия иммунной системе макроорганизма, поскольку они обладают наиболее разнообразными и эффективными приспособительными механизмами, позволяющими им циркулировать в природных очагах и выживать в организме млекопитающих. Традиционной моделью для изучения взаимоотношений бактериальных патогенов с организмами хозяина и переносчика является возбудитель чумы – *Y. pestis*. Для успешной циркуляции возбудителя в природных очагах необходимо наличие полного спектра генетических детерминант, определяющих его адаптивный потенциал [2 – 4]. В отличие от вирусных инфекций при болезнях, вызванных патогенными бактериями, организм хозяина подвергается воздействию не самих генетических

структур возбудителя, а кодируемых ими продуктов, экспрессия которых зависит от наличия в организме хозяина необходимых для нее условий. Поэтому для выявления факторов, обуславливающих патогенные свойства микроба, необходимо изучение систем и молекул в условиях экспериментального инфекционного процесса. Большой вклад в адаптивный потенциал *Y. pestis* вносят секретируемые им функциональные молекулы, например протеолитические и антиоксидантные ферменты. Основной мишенью для протеолитических ферментов бактерий являются сигнальные и эффекторные молекулы иммунной защиты. Например, протеазу Pla чумного микроба рассматривают в качестве основного фактора, опосредованно влияющего на генерализацию инфекционного процесса (в результате лизиса фибриновых сгустков, препятствующих распространению патогена) [3]. Благодаря супероксиддисмутазам (СОД) и каталазам патогены утилизируют супероксиданион и перекись водорода, которые образуются в результате респираторного взрыва при фагоцитозе [5].

Генетические структуры, определяющие патогенный потенциал чумного микроба, так же как его биохимическую активность, изучены не в пол-

Таблица 1.
Характеристика тестируемых штаммов чумного микроба

| Штамм | Место выделения | Плазмидный состав |
|---|--------------------------------------|---|
| <i>Y. pestis</i> subsp. <i>pestis</i> И-2638 | Тувинский природный очаг чумы | pYP (6 мДа) pYV (45 мДа) pYT (61 мДа) pTP33 (22,5 мДа) |
| <i>Y. pestis</i> subsp. <i>pestis</i> И-3479* | Иркутский противочумный институт | pYP (6 мДа) pYT (61 мДа) pTP33 (21,5 мДа) |
| <i>Y. pestis</i> subsp. <i>pestis</i> И-3480* | Иркутский противочумный институт | pYT (61 мДа) pTP33 (21,5 мДа) |
| <i>Y. pestis</i> subsp. <i>pestis</i> И-3560 | Алтайский горный природный очаг чумы | pYP (6 мДа) pYV (45 мДа) pYT (61 мДа) pTP33 (22,5 мДа) |
| <i>Y. pestis</i> subsp. <i>altaica</i> И-2359 | Алтайский горный природный очаг чумы | pYP (6 мДа) pYV (45 мДа) pYT (65 мДа) |
| <i>Y. pestis</i> subsp. <i>altaica</i> И-2948 | Алтайский горный природный очаг чумы | pYV (45 мДа) pYT (65 мДа) |
| <i>Y. pestis</i> subsp. <i>altaica</i> И-2948/3 | Алтайский горный природный очаг чумы | pYT (65 мДа) |

Примечание: *Штаммы селекционированы из штамма *Y. pestis* subsp. *pestis* И-2638.

ной мере. Полагают, что детерминанты метаболитов, которые опосредуют способность возбудителя преодолевать иммунные барьеры макроорганизма, могут быть локализованы как на хромосоме, так и на плазмидах [6]. Тем не менее основную роль в формировании патогенного потенциала *Y. pestis* играют плазмиды, поскольку значительная доля факторов патогенности и регуляторных систем, координирующих их экспрессию, находится под контролем генов, локализованных на плазмидах rYV, rYP и rYT. В связи с этим исследования, посвященные изучению роли плазмид чумного микроба в организации его метаболического статуса и вирулентности, не утратили актуальности.

Цель настоящей работы – изучение протеолитической и супероксиддисмутазной активности штаммов *Y. pestis* с разным плазмидным спектром.

Материалы и методы

В работе использовали семь штаммов *Y. pestis* из коллекции музея Иркутского научно-исследовательского противочумного института (табл. 1).

Культуры выращивали на агаре Хоттингера при 28 °С в течение 48 часов. Из полученных агаровых культур готовили взвесь 10^9 микробных клеток (м.к.) в фосфатном буфере (для определения активности: протеолитической – рН 8,0 и супероксиддисмутазной – рН 7,8).

Все манипуляции с культурами *Y. pestis* проводили в боксе микробиологической безопасности I II класса в соответствии с СП 1.3.3118-13

«Безопасность работы с микроорганизмами I – II групп патогенности (опасности)».

Протеолитическую активность (ПА) чумного микроба определяли в экстрактах, полученных путем обработки микробной взвеси лизоцимом (2 мг/мл), с последующей инкубацией при 37 °С в течение 60 минут и центрифугированием в течение 10 минут при 4000 об./мин. Протеолитическую активность супернатанта устанавливали фотокolorиметрическим методом, описанным Х. Биссвангером [7]. Экстинкцию образцов выявляли на спектрофотометрическом анализаторе ELx 808 Biotex (США) при длине волны 340 нм. За единицу протеолитической активности принимали единицу активности трипсина.

Для определения активности супероксиддисмутазы (СОД) в микробную взвесь, приготовленную в фосфатном буфере с рН 7,8, добавляли лизоцим (Sigma, США) до концентрации 2 мг/мл. Взвесь инкубировали при 37 °С в течение 60 минут, затем центрифугировали 10 минут при 4000 об./мин. В лунки планшета добавляли по 0,05 мл супернатанта. В бланкирующую и контрольные лунки вместо ферментных препаратов вносили 0,05 мл фосфатного буфера. Затем во все лунки, включая бланкирующую, добавляли по 0,065 мл смеси 0,16 М раствора феназинметосульфата (Sigma, США) и 0,61 мМ нитросинего тетразолия (Sigma, США) в соотношении 1,5/5 мл. Реакцию начинали

внесением во все лунки по 0,035 мл 1 мМ раствора НАДН (Sigma, США). Результаты регистрировали на спектрофотометрическом анализаторе ELx 808 Biotex (США) при длине волны 540 нм. За единицу активности фермента принимали такое количество фермента, которое уменьшало скорость неингибированной реакции на 50%.

Статистическую обработку данных проводили при помощи стандартного пакета прикладных программ Statistica, версия 6.1 (Copyright® StatSoft, Inc 19842001, ИПЧИ 31415926535897). При анализе данных определяли тип распределения с помощью тестов Колмогорова–Смирнова, Лиллиефорса и Шапиро–Уилка. Однородность дисперсий оценивали по критерию Левена. Для решения проблемы множественных сравнений статистическую обработку средних величин проводили с использованием критерия ANOVA. Для определения достоверности различий путем попарного сравнения групп использовали t-критерий Стьюдента для независимых выборок с поправкой Бонферрони и F-критерий. Данные представлены в виде среднего арифметического \pm среднего квадратичного отклонения. Различия считали достоверными при уровне значимости $p < 0,01$.

Результаты и обсуждение

Активность СОД в препаратах, выделенных из агаровых культур исследуемых штаммов *Y. pestis*, составляла примерно 0,35 ед./5 $\times 10^6$ м.к. В процессе исследования достоверных различий по активности СОД между изученными штаммами чумного микроба с разным плазмидным составом не выявлено. Эти результаты согласуются с данными ряда авторов, которые установили, что супероксиддисмутазная активность является термоиндуцибельным признаком и не связана с носительством плазмид [8, 9].

У изученных штаммов обнаружены различия по ПА (табл. 2). Например, у вирулентного штамма *Y. pestis* subsp. *pestis* И-2638, выделенного в Тувинском природном очаге, данный показатель превышал в 25 раз ПА его изогенных вариантов – *Y. pestis* subsp. *pestis* И-3479 и *Y. pestis* subsp. *pestis* И-3480 (5,0 ед./5 $\times 10^6$ м.к. и $\leq 0,2$ ед./5 $\times 10^6$ м.к. соответственно ($p < 0,001$). Для этих штаммов чумного микроба показана прямая зависимость степени ПА от наличия в их геноме плазмиды rYV.

У штаммов *Y. pestis* subsp. *pestis* И-3560 и *Y. pestis* subsp. *altaica* И-2359, имеющих в своем геноме rYV, также выявлена высокая ПА (10,3 ед. и $8,60 \pm 1,30/5 \times 10^6$ м.к. соответственно). Определено, что значение ПА атипичного штамма *Y. pestis* subsp. *altaica* И-2948, в геном которого тоже входит rYV, несколько ниже ($4,60 \pm 0,70/5 \times 10^6$ м.к.), чем таковое у *Y. pestis* subsp. *pestis* И-3560 и *Y. pestis* subsp. *altaica* И-2359 ($p < 0,001$). Однако этот показатель у *Y. pestis* subsp. *altaica* И-2948

значительно выше, чем у изогенного варианта *Y. pestis* subsp. *altaica* И-2948/3 (pYV⁻) ($p < 0,001$). Эти данные позволили сделать заключение, что у штаммов *Y. pestis* subsp. *pestis* И-3560 и *Y. pestis* subsp. *altaica* И-2948 активность ПА также связана с pYV (табл. 2).

На основании полученных данных сложно сделать выводы в отношении взаимосвязи уровня ПА культивируемой *in vitro* *Y. pestis* и степени ее вирулентности, хотя очевидно, что использованные в эксперименте высоковирулентные штаммы чумного микроба обладают высокой ПА – по сравнению с вариантами, имеющими ее самое низкое значение.

Следует подчеркнуть, что в настоящей работе изучена совокупность систем, обладающих протеолитической активностью, поскольку в экспериментах использовали неочищенные ферментные препараты (экстракты чумного микроба). В число

функциональных молекул таких экстрактов микроорганизмов могут входить как конститутивные, так и индуцибельные ферменты. Последние зачастую определяют устойчивость патогена к защитным механизмам хозяина и экспрессируются только в процессе развития инфекции.

Маловероятно, что исследованные штаммы *Y. pestis* в полной мере проявили свой патогенный потенциал (включая экспрессию ПА и СОД), так как микроорганизмы в условиях культуры *in vitro* не сталкиваются с защитными факторами иммунной системы макроорганизма. Условия искусственного культивирования и стрессовые факторы (лизозим, отсутствие питательной среды и т.д.), которым подвергались клетки микроорганизма во время эксперимента, несопоставимы по действенности и разнообразию с факторами иммунной системы макроорганизма. Тем не менее показатель степе-

Таблица 2.
Протеолитическая и супероксиддисмутазная активность штаммов чумного микроба с разным плазмидным составом

| Штаммы <i>Y. pestis</i> | Плазмидный состав | LD50 для белых мышей, м.к. | ПА, ед./5 x 10 ⁶ м.к. | СОД, ед./5 x 10 ⁶ м.к. |
|---|---|----------------------------|----------------------------------|-----------------------------------|
| <i>Y. pestis</i> subsp. <i>pestis</i> И-2638 | pYP (6 мДа) pYV (45 мДа) pYT (61 мДа) pTP33 (22,5 мДа) | 10 | 5,0 ± 0,70 | 0,34 ± 0,055 |
| <i>Y. pestis</i> subsp. <i>pestis</i> И-3479 | pYP (6 мДа) pYT (61 мДа) pTP33 (21,5 мДа) | > 10 ⁶ | ≤ 0,20 | 0,42 ± 0,07 |
| <i>Y. pestis</i> subsp. <i>pestis</i> И-3480 | pYT (61 мДа) pTP33 (21,5 мДа) | > 10 ⁶ | ≤ 0,20 | 0,24 ± 0,04 |
| <i>Y. pestis</i> subsp. <i>pestis</i> И-3560 | pYP (6 мДа) pYV (45 мДа) pYT (61 мДа) pTP33 (22,5 мДа) | 4 | 10,30 ± 1,50 | 0,35 ± 0,05 |
| <i>Y. pestis</i> subsp. <i>altaica</i> И-2359 | pYP (6 мДа) pYV (45 мДа) pYT (65 мДа) | 4 × 10 ⁵ | 8,60 ± 1,30 | 0,45 ± 0,07 |
| <i>Y. pestis</i> subsp. <i>altaica</i> И-2948 | pYV (45 мДа) pYT (65 мДа) | 7 × 10 | 4,60 ± 0,70 | 0,36 ± 0,05 |
| <i>Y. pestis</i> subsp. <i>altaica</i> И-2948/3 | pYT (65 мДа) | 2,5 × 10 ⁸ | 1,00 ± 0,16 | 0,29 ± 0,04 |

ни ПА чумного микроба может быть использован в качестве предварительной оценки его патогенного потенциала.

В дальнейшей работе, возможно, следует использовать экспериментальный подход, предусматривающий изучение экспрессии адаптивных систем патогенных микроорганизмов в динамике инфекционного процесса. Некоторые исследователи применяют такой подход для сравнительной оценки роли отдельных факторов патогенности возбудителей инфекционных болезней [10, 11].

Выводы

1. Достоверных различий по активности супероксиддисмутазы между референтными штаммами чумного микроба, выделенными в Алтайском горном и Тувинском природных очагах, и их изогенными субкультурами не выявлено.
2. Штаммы чумного микроба разных подвидов, отличающиеся по плазмидному профилю, обладают протеолитической активностью, уровень которой может в некоторой степени зависеть от наличия в геноме плазмиды *pYV*.

Литература

1. Гариб Ф.Ю. Взаимодействие патогенов с врожденным иммунитетом. Москва: Издательство Московского университета; 2013.
2. Анисимов А.П. Молекулярно-генетические механизмы образования и функциональная значимость капсулы *Yersinia pestis*: Дис. ... д-ра мед. наук. Саратов – Оболensk; 1999.
3. Анисимов А.П. Факторы *Yersinia pestis*, обеспечивающие циркуляцию и сохранение возбудителя чумы в экосистемах природных очагов. Сообщение 1. Молекулярная генетика. 2002; 3: 3 – 23.
4. Кутырев В.В. Генетический анализ факторов вирулентности возбудителя чумы: Дис. ... д-ра мед. наук. Саратов; 1992.
5. Курбанов А.И. Антиоксидантные ферменты микроорганизмов как потенциальные факторы патогенности. Международный медицинский журнал. 2009; 15 (1): 136 – 139.
6. Кэмпбелл Г., Деннис Д. Чума. From Harrison's Principles of Internal Medicine. 14th edition. Available at: http://medbiol.ru/medbiol/infect_har/004401d0.htm#00441e5f.htm.
7. Биссвангер Х. Практическая энзимология. Москва: БИНОМ. Лаборатория знаний; 2013.
8. Видяева Н.А., Гаева А.В., Куклева Л.М., Одинок Г.Н., Кутырев В.В. Сравнительная характеристика антиоксидантных ферментов штаммов *Yersinia pestis* различных подвидов и *Yersinia pseudotuberculosis*. Проблемы особо опасных инфекций. 2008; 96: 29 – 32.
9. Куликов О.А., Дробков В.И., Дармов И.В. и др. Супероксиддисмутазы чумного микроба. Вестн. Рос. АМН. 1996; 6: 45 – 49.
10. Брудастов Ю.А., Дерябин Д.Г., Сборец Т.С. Активность каталазы и супероксиддисмутазы *Staphylococcus aureus* при их персистенции в макроорганизме. Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2001; 2: 13 – 16.
11. Курбанов А.И. Экспериментальное изучение роли антиоксидантных ферментов *Candida albicans* в патогенезе кандидоза. Проблемы медицинской микологии. 2008; 2: 14 – 16.

References

1. Garib F.Yu. Pathogen interaction with the innate immunity: manual for a special course infections and immunity. Moscow: Moscow university press; 2013 (in Russian).
2. Anisimov A.P. Molecular and genetic mechanisms of formation and the functional significance of the capsule of *Yersinia pestis*: PhD of med. sci. diss. Saratov, Obolensk; 1999 (in Russian).
3. Anisimov A.P. The *Yersinia pestis* factors maintaining the reproduction and the perpetuation of the plague bacillus in the ecosystems of natural pest-holes. Communication 1. Molecular Genetics. 2002; 3: 3 – 23 (in Russian).
4. Kutyrev V.V. Genetic analysis of virulence factors of plague: PhD of med. sci. diss. Saratov; 1992 (in Russian).
5. Kurbanov A.I. Antioxidant enzymes of microorganisms as potential factors of pathogenicity. International Medical Journal. 2009; 15 (1): 136 – 139.
6. Campbell G., Dennis D. Plague. From Harrison's Principles of Internal Medicine. 14-th edition. Available at: http://medbiol.ru/medbiol/infect_har/004401d0.htm#00441e5f.htm (in Russian).
7. Bisswanger H. Practical Enzymology. Moscow: BKL Publishers; 2013 (in Russian).
8. Vidyayeva N.A., Gaeva A.V., Koukleva L.M., Odinokov G.N., Kutyrev V.V. Comparative Characteristics of Antioxidative Enzymes of *Yersinia pestis* strains of different subspecies and *Yersinia pseudotuberculosis* strains. Problems of Particularly Dangerous Infections. 2008; 96: 29 – 32 (in Russian).
9. Kulikov O.A., Drobkov V.I., Darmov I.V. et al. Superoxide dismutases of *Y. pestis*. Annals of the Russian Academy of Medical Sciences. 1996; 6: 45 – 49 (in Russian).
10. Brudastov Yu.A., Deryabin D.G., Sboretz T.S. The activity of catalase and superoxide dismutase of *Staphylococcus aureus* on their persistence in macroorganism. Journal in Microbiology, Epidemiology and Immunobiology. 2001; 2: 13 – 16 (in Russian).
11. Kurbanov A.I. The role of *Candida albicans'* antioxidant enzymes on pathogenesis in candidosis (experimental studying). Problems in medical mycology. 2008; 2: 14 – 16 (in Russian).