

Г.В.Демидова, Е.П.Соколова, В.П.Зюзина, В.А.Рыкова,  
И.В.Морозова, О.Н.Подладчикова, В.И.Тынянова

## ВЛИЯНИЕ ВНЕХРОМОСОМНЫХ ЭЛЕМЕНТОВ НАСЛЕДСТВЕННОСТИ НА ТОКСИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА *YERSINIA PESTIS*

Ростовский-на Дону противочумный институт

*Цель.* Выяснение роли внехромосомных элементов наследственности в проявлении токсических свойств *Yersinia pestis*. *Материалы и методы.* Работа выполнена на вакцинном штамме *Y. pestis* EV76 (pMT1, pCD1, pPCP1) и бесплазмидных вариантах вакцинного EV76 (pMT1<sup>-</sup>, pCD1<sup>-</sup>, pPCP1<sup>-</sup>) и вирулентного 231 (pMT1<sup>-</sup>, pCD1<sup>-</sup>, pPCP1<sup>-</sup>) штаммов *Y. pestis*. О присутствии функционально активной формы липополисахарида (ЛПС) в среде инкубации бактерий судили по токсичности супернатантов клеток *Y. pestis* для интактных животных (модель инфекционно-токсического шока) и мышей, сенсибилизированных D-GalN. *Результаты.* Установлено, что 37°C культуры *Y. pestis* EV76, содержащие полноценный набор плазмид, высвобождают ЛПС во внешнюю среду. Бесплазмидные варианты как вакцинного, так и вирулентного штаммов *Y. pestis* pMT1<sup>-</sup>, pCD1<sup>-</sup>, pPCP1<sup>-</sup> такой способностью не обладают. Отделение ЛПС от клеточной стенки выявлено у живых бактерий возбудителя чумы. Предполагается, что этот процесс сопряжен с транслокацией белков, кодируемых плазмидами pMT1, pCD1, pPCP1, из клетки во внешнюю среду. *Заключение.* Впервые установлена функциональная взаимосвязь между внехромосомными элементами наследственности и токсической активностью ЛПС *Y. pestis*.

Журн. микробиол. 2017, № 2, С. 28—33

Ключевые слова: *Yersinia pestis*, плазмиды, липополисахарид, токсичность

G.V.Demidova, E.P.Sokolova, V.P.Zyuzina, V.A.Rykova,  
I.V.Morozova, O.N.Podladchikova, V.I.Tynyanova

## EFFECT OF EXTRACHROMOSOMAL ELEMENTS OF HEREDITY ON TOXIC PROPERTIES OF *YERSINIA PESTIS*

Rostov-on-Don Institute for Plague Control, Russia

*Aim.* Elucidation of the role of extrachromosomal elements of heredity in manifestations of toxic properties of *Yersinia pestis*. *Materials and methods.* The study was carried out in vaccine strain *Y. pestis* EV76 (pMT1, pCD1, pPCP1) and non-plasmid variants of vaccine EV76 (pMT1<sup>-</sup>, pCD1<sup>-</sup>, pPCP1<sup>-</sup>) and virulent 231 (pMT1<sup>-</sup>, pCD1<sup>-</sup>, pPCP1<sup>-</sup>) strains of *Y. pestis*. Presence of functionally active form of lipopolysaccharide (LPS) in the incubation medium of the bacteria was evaluated via toxicity of supernatant of *Y. pestis* for intact animals (infection-toxic shock) and mice sensitized by D-GalN. *Results.* 37°C cultures of *Y. pestis* EV76 containing a full amount of plasmids were established to release LPS into the environment. Non-plasmid variants of both vaccine and virulent strains of *Y. pestis* pMT1<sup>-</sup>, pCD1<sup>-</sup>, pPCP1<sup>-</sup> do not have this ability. Separation of LPS from cell wall was detected in live bacteria of plague infectious agent. This process is assumed to be coupled with translocation of proteins coded by pMT1, pCD1, pPCP1 plasmids from the cell into the environment. *Conclusion.* Functional inter-connection between extrachromosomal elements of heredity and toxic activity of *Y. pestis* LPS is established for the first time.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2017, No. 2, P. 28—33

Key words: *Yersinia pestis*, plasmids, lipopolysaccharide, toxicity

## ВВЕДЕНИЕ

Известно, что патогенез чумы в любой ее форме представляет собой стадии развития инфекционно-токсического шока, вызванного действием липополисахарида (ЛПС) возбудителя [1, 3]. Биологически активный полимер ЛПС является компонентом клеточной стенки грамотрицательных бактерий. Для проявления токсических свойств ЛПС необходимо его отделение от внешней мембраны бактерий и представление рецепторам иммунокомпетентных клеток макроорганизма в свободной молекулярной форме. В опытах *in vitro* и *in vivo* показано, что целые клетки *Y. pestis* и препараты ЛПС, выделенные из этих культур, обладают различными иммуномодулирующими свойствами [12]. Максимальное воздействие на рецепторный комплекс TLR4/MD2 оказывает свободная форма ЛПС. В то же время, эффект действия ЛПС, связанного с бактериальной клеткой, незначителен. Объясняется это тем, что токсически активная часть ЛПС (липид А) жестко фиксирована физико-химическими связями с белками внешней мембраны бактерий, что исключает участие липида А в активации фагоцитарных клеток макроорганизма. Из данных литературы известно, что ЛПС в свободной форме в небольших количествах может высвобождаться в среду при делении клеток, при разрушении бактерий в процессе фагоцитоза, под действием комплекса белков системы комплемента и от антибиотиков, а также обнаруживается в составе бактериальных везикул [9].

Особенность *Y. pestis* состоит в том, что источником функционально активной формы ЛПС являются не разрушенные, а живые клетки бактерий. По наблюдению врачей-клиницистов действие эндотоксина максимально на терминальной стадии инфекции, когда стремительное размножение бактерий сопровождается гиперпродукцией цитокинов, что приводит к развитию септического шока и гибели организма [3, 13].

Вопрос о том, каким образом бактерии *Y. pestis* отделяют ЛПС от клеточной стенки во внешнюю среду, специально не исследовался. Мы предположили, что освобождению ЛПС способствует система белков, кодируемых резидентными плазмидами *Y. pestis*. В пользу высказанного предположения свидетельствуют данные о структурно-функциональной организации плазмид *rMT1*, *rCD1*, *rPCP1* и их роли в проявлении вирулентных свойств *Y. pestis* [1, 11]. При анализе работ, посвященных этим вопросам, мы обратили внимание на тот факт, что все белки, кодируемые плазмидами, локализованы, как правило, на внешней мембране клеточной стенки бактерий или же секретируются во внешнюю среду, то есть вектор транслокации белков направлен из клетки. Так, плазида *rCD1* кодирует белки системы секреции III типа (T3SS) и эффекторные белки *Yops* дистанционного действия. Плазида пестициногенности *rPCP1* уникальна для *Y. pestis*, содержит *pla* и *psn* гены. Бактериоцин пестицин секретируется во внешнюю среду, а протеаза *Pla* локализована на внешней мембране клеток возбудителя чумы. Плазида *rMT1* — кодирует два важных видоспецифических белка: фракцию I и «мышинный» токсин (MT). Фракция I формирует на поверхности микроба капсулу, которая не имеет жесткой связи с поверхностными структурами клетки, легко отделяется от них и диффундирует во внешнюю среду. Примечательно, что в состав капсульного вещества входят как MT, так и ЛПС клеточной стенки бактерий [7]. Изложенное выше позволило предположить, что процесс отделения молекул ЛПС от клеточной мембраны сопряжен с процессом транслокации кодируемых плазмидами *Y. pestis* белков из клетки во вне.

Цель настоящей работы заключалась в выяснении роли внехромосомных элементов наследственности в проявлении токсических свойств *Y. pestis*.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для выяснения вопроса о функциональной взаимосвязи между экспрессией генов резидентных плазмид и активностью эндотоксина *Y. pestis* использованы два методических приема: модель инфекционно-токсического шока, описанная А.Н. Кравцовым и др. [5], и модель сенсibilизации биопробных животных D-галактозамином (D-Gal) [10]. Оба метода позволяют судить о присутствии функционально активной формы ЛПС в среде инкубации бактерий по ее токсичности для биопробных животных. Модель, предложенная Кравцовым А.Н., основана на трансформации ЛПС из биологически инертного в токсически активную форму в условиях *in vitro*. Процесс валиден терминальной стадии инфекции и осуществляется под влиянием биологически активного вещества, присутствующего в гемолизованных эритроцитах крови и тканях паренхиматозных органов млекопитающих. В условиях макроорганизма токсическое действие ЛПС реализуется через рецепторный комплекс TLR4/MD2 фагоцитарных клеток [6,8]. В случае с D-GalN механизм токсического действия ЛПС на макроорганизм иной — провоспалительный цитокин TNF- $\alpha$ , синтез которого индуцирует ЛПС, активирует специфические рецепторы апоптоза клеток печени (Fas R), что приводит к гибели гепатоцитов и организма в целом. Чувствительность метода инфекционно-токсического шока, определенная для ЛПС вакцинного штамма *Y. pestis* EV76, составляет приблизительно 40 мкг/мышь [7]. Чувствительность к ЛПС этого же штамма в условиях D-Gal равна 5 — 10 мкг/мышь [2]. Оба метода высокоэффективны для детекции свободной формы ЛПС *Y. pestis* в условиях *in vivo*.

Экспериментальная работа выполнена на вакцинном штамме *Y. pestis* EV76 (pMT1, pCD1, pPCP1). Из него был получен бесплазмидный вариант (pMT1<sup>-</sup>, pCD1<sup>-</sup>, pPCP1<sup>-</sup>). Отсутствие интеграции плазмид с хромосомной ДНК подтверждено методом ПЦР с праймерами, комплементарными плазмидным генам *saI1* (плазмиды pMT1), *lcrV* (плазмиды pCD1) и *pla* (плазмиды pPCP1). Штамм депонирован в Государственной коллекции патогенных бактерий под № КМ 1279, ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» (Саратов). Бесплазмидный вариант вирулентного штамма *Y. pestis* 231 (pMT1<sup>-</sup>, pCD1<sup>-</sup>, pPCP1<sup>-</sup>) предоставлен проф. А.П.Анисимовым (ГНЦ ПМБ, Оболенск).

Выбор вакцинного штамма *Y. pestis* EV76 для проведения настоящего исследования не случаен. Клетки этого штамма не способны преодолевать неспецифический иммунный барьер макроорганизма и не вызывают гибели животных при внутрибрюшинном введении дозы  $1 \times 10^8$  м.к./мышь. В то же время, основной патогенетический фактор — эндотоксин — у этого штамма сохранен и его действие проявляется при внутривенном введении бактерий биопробным животным [14] или же в условиях, соответствующих инфекционно-токсическому шоку, описанных нами ранее [5].

При использовании модели инфекционно-токсического шока культуры вакцинного штамма *Y. pestis* EV76 и бесплазмидные варианты вирулентного и вакцинного штаммов выращивали на плотной питательной среде LB (Difco, США) в течение 18 — 24 часов при 37°C. Для перевода ЛПС в токсически активную форму клетки исследуемых штаммов *Y. pestis* вносили в гемолизованные эритроциты крови человека в количестве 1 —  $5 \times 10^{10}$  м.к./мл и инкубировали 3 часа при 37°C. Затем клетки осаждали центрифугированием (5 мин при 12000 об./мин), а супернатанты вводили мышам внутрибрюшинно в объеме 0,1 мл. В супернатанте содержалось от  $1 \times 10^4$  до  $5 \times 10^4$  м.к./мл. О присутствии ЛПС в супернатантах судили по гибели животных в течение первых двух суток наблюдения. Каждая экспериментальная группа содержала 6 — 10 мышей.

Обработку мышей D-GalN проводили по методу Galanos C. et al. в нашей модификации [2]. Для этого культуры *Y. pestis* всех используемых вариантов выращивали на плотной питательной среде LB (Difco, США) в течение 18 — 24 часов при 37°C. Взвесь бактерий концентрацией  $1 \times 10^{10}$  м.к./мл готовили на физиологическом растворе NaCl и инкубировали 3 часа при 37°C. Затем клетки осаждали центрифугированием в течение 5 мин при 12 000 об./мин. Полученный супернатант вводили мышам совместно с 20 мкг D-GalN внутрибрюшинно в объеме 0,1 мл. В супернатанте содержалось от  $1 \times 10^4$  до  $5 \times 10^4$  м. к./мл. О присутствии ЛПС в инокулятах судили по гибели животных в течение первых двух суток. Каждая экспериментальная группа содержала 6 — 10 мышей.

В экспериментах также использовали культуры *Y. pestis* EV76 (pMT1, pCD1, pPCP1), убитые кипячением при 100°C в течение 30 мин.

В качестве контроля экспериментальным животным вводили внутрибрюшинно и внутривенно по 0,1 мл миллиардной взвеси клеток полноценного штамма *Y. pestis* EV76 и бесплазмидных вариантов вакцинного и вирулентного штаммов, выращенных на плотной питательной среде LB (Difco, США) в течение 18 часов при 37°C.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

Результаты проведенных экспериментов свидетельствуют о принципиальных различиях в токсических свойствах *Y. pestis* EV76 (pMT1, pCD1, pPCP1) и бесплазмидных вариантов *Y. pestis* EV76 (pMT1<sup>-</sup>, pCD1<sup>-</sup>, pPCP1<sup>-</sup>) и *Y. pestis* 231 (pMT1<sup>-</sup>, pCD1<sup>-</sup>, pPCP1<sup>-</sup>) (табл.). Как следует из данных, приведенных в табл., супернатант полноценного штамма *Y. pestis* EV76, полученный после инкубации клеток в гемолизированных эритроцитах крови человека, токсичен для животных и вызывает гибель мышей в 100% случаев в течение первых двух суток наблюдения. В то же время, супернатанты бесплазмидных вариантов вакцинного *Y. pestis* EV76 и вирулентного штаммов *Y. pestis* 231 в этих же условиях постановки эксперимента не токсичны для животных. Аналогичные результаты были получены при использовании модели D-GalN. На фоне D-GalN среда инкубации клеток вакцинного штамма *Y. pestis* EV76 проявляет выраженный токсический эффект и вызывает гибель 100% животных. Бесплазмидные варианты вакцинного и вирулентного штаммов *Y. pestis* в

**Токсичность *Y. pestis* EV76 (pMT1, pCD1, pPCP1) и бесплазмидных вариантов *Y. pestis* EV76 (pMT1<sup>-</sup>, pCD1<sup>-</sup>, pPCP1<sup>-</sup>) и *Y. pestis* 231 (pMT1<sup>-</sup>, pCD1<sup>-</sup>, pPCP1<sup>-</sup>) для мышей при разных условиях постановки экспериментов**

Условия постановки экспериментов	Число павших животных/число взятых в опыт животных			
	<i>Y. pestis</i> EV76 (pMT1, pCD1, pPCP1)	<i>Y. pestis</i> EV76 (pMT1 <sup>-</sup> , pCD1 <sup>-</sup> , pPCP1 <sup>-</sup> )	<i>Y. pestis</i> 231 (pMT1 <sup>-</sup> , pCD1 <sup>-</sup> , pPCP1 <sup>-</sup> )	<i>Y. pestis</i> EV76 (pMT1, pCD1, pPCP1)
	Живые клетки	Убитые клетки	Живые клетки	Живые клетки
1. Супернатанты клеток <i>Y. pestis</i> . Модель инфекционно-токсического шока	70/70	0/30	0/40	0/10
2. Супернатанты клеток <i>Y. pestis</i> . Модель D-GalN	36/36	0/30	0/30	0/12
3. Внутривенное введение клеток <i>Y. pestis</i>	10/10	—	0/10	0/10
4. Внутрибрюшинное введение клеток <i>Y. pestis</i>	0/12	—	0/12	0/12

равной мере не токсичны для биопробных животных. Обращает на себя внимание тот факт, что различия в токсическом действии полноценных и бесплазмидных вариантов *Y. pestis* имеют не количественный, а качественный характер.

Столь же резко отличается токсичность живых и убитых кипячением клеток полноценного вакцинного штамма *Y. pestis* EV76. В отличие от живых бактерий среда инкубации мертвых клеток не токсична для мышей и не вызывает их гибели.

Качественные различия между полноценными и бесплазмидными вариантами *Y. pestis* EV76 подтверждают также результаты опытов по внутривенному введению культур биопробным животным. Введение клеток полноценного вакцинного штамма *Y. pestis* EV76 в хвостовую вену в количестве  $1 \times 10^8$  м. кл. вызывает развитие типичного инфекционного процесса. Бесплазмидные варианты *Y. pestis* в тех же условиях не проявляют токсических свойств, и гибели животных не наблюдается.

## ОБСУЖДЕНИЕ

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о функциональной взаимосвязи между резидентными плазмидами и токсической активностью ЛПС *Y. pestis*. Впервые установлено, что клетки *Y. pestis* EV76, содержащие полноценный набор плазмид, способны высвобождать ЛПС во внешнюю среду, и этот процесс не связан с разрушением бактерий, а является функцией живых клеток возбудителя чумы. Варианты *Y. pestis*, лишенные внехромосомных элементов наследственности, такой способностью не обладают. Очевидно, что отделению ЛПС от клеточной стенки бактерий способствуют белки, кодируемые резидентными плазмидами *Y. pestis*. Видимо, этот процесс сопряжен с транслокацией кодируемых плазмидами рMT1, рCD1, рPCP1 белков на наружную поверхность клеток либо во внешнюю среду. Примером может служить недавно установленный факт ЛПС-белкового взаимодействия между высокотемпературной формой ЛПС и белком Pla плазмиды пестициногенности рPCP1. Комплекс локализован на внешней мембране клетки, а функциональная активность Pla проявляется только при его сочетании с молекулой ЛПС [3].

В реализации токсического потенциала ЛПС *Y. pestis*, на наш взгляд, основная роль принадлежит капсульной субстанции возбудителя чумы. Как известно, капсулу на поверхности микроба формирует фракция I (FI) — белок, кодируемый плазмидой рMT1. Продукция капсулы строго зависит от температуры и максимальна при 37°C. Несмотря на то, что FI давно известна, выделена, очищена, установлены гены, ответственные за синтез и сборку, ее роль в инфекционном процессе при чуме до сих пор не совсем понятна [4].

Ранее в экспериментах *in vitro* и *in vivo* мы установили, что капсульная субстанция бактерий *Y. pestis* является носителем функционально активной формы ЛПС [7]. Как было отмечено ранее, биологическое своеобразие капсульного вещества *Y. pestis* заключается в отсутствии жесткой связи с поверхностными структурами клетки, в результате чего капсула легко отделяется от них и диффундирует во внешнюю среду. Предполагаем, что при отделении капсулы от клеток все биомолекулы, находящиеся на поверхности внешней мембраны и не имеющие ковалентной связи с близлежащими полимерами, включая молекулы ЛПС, «стягиваются» вместе с капсулой в среду инкубации бактерий. Процесс осуществляется на терминальной стадии инфекции и является центральным моментом патогенеза чумы. Накопление ЛПС в составе

капсульной субстанции происходит пропорционально росту и размножению бактерий в организме млекопитающих. После отделения капсульного вещества от клеток под влиянием биологически активных веществ паренхиматозных органов — литические ферменты и биологически активный гликолипид — капсула разрушается, а малотоксичный высокотемпературный ЛПС трансформируется в токсически активную форму [8]. Дальнейшее действие эндотоксина *Y. pestis* канонично и осуществляется по схеме, типичной для ЛПС грамотрицательных бактерий. Переход ЛПС от связанного состояния к свободной форме — необходимый этап в реализации токсического потенциала ЛПС *Y. pestis*. Молекулярные механизмы этого процесса и степень участия в нем каждой из плазмид *Y. pestis* является предметом дальнейших специальных исследований.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Анисимов А.П. Факторы *Yersinia pestis*, обеспечивающие циркуляцию и сохранение возбудителя чумы в экосистемах природных очагов. Мол. генетика, микробиол., вирусол. 2002, 3: 3-23.
2. Демидова Г.В., Зюзина В.П., Соколова Е.П. и др. Токсичность липополисахаридов вакцинного штамма *Yersinia pestis* EV 76 для белых мышей, сенсибилизированных D-галактозамином. Журн. микробиол. 2011, 1: 74-76.
3. Евсеева В.В., Платонов М.Е., Копылов П.Х., Дентовская С.В., Анисимов А.П. Активатор плазмидогена чумного микроба. Инфекция и иммунитет. 2015, 5 (1): 27-36.
4. Кадникова Л.А., Копылов П.Х., Дентовская С.В., Анисимов А.П. Капсульный антиген чумного микроба. Инфекция и иммунитет. 2015, 5 (3): 201-218.
5. Кравцов А.Н., Тынянова В.И., Зюзина В.П. Повышение вирулентности бактерий *Yersinia pestis* при инкубации клеток в гемолизированных эритроцитах крови человека. Журн. микробиол. 1993, 4: 3-6.
6. Рыжко И.В., Мишанькин М.Б., Тынянова В.И., Цураева Р.И., Молдован И.А. Способ прогнозирования клинической эффективности антибактериальных, вакцинных препаратов, средств пассивной анитоксической иммунотерапии на модели инфекционно-токсической формы чумы у мышей. Патент № 2303821 от 27.07.2007.
7. Соколова Е.П. Механизмы активации токсических субстанций чумного микроба. Автореф. дис. канд. биол. наук. Ростов-на-Дону, 2002.
8. Тынянова В.И., Зюзина В.П., Демидова Г.В., Соколова Е.П. Специфичность иммуномодулирующего действия эндотоксина чумного микроба. Журн. микробиол. 2016, 3: 104-112.
9. Eddy J., Gielda L., Caulfield A. et al. Production of outer membrane vesicles by the plague pathogen *Yersinia pestis*. PLoS One. 2014, 9 (9): e107002.
10. Galanos C., Freudenberg M. A., Reuter W. Galactosamine-induced sensitization to the lethal effects of endotoxin Proc. Natl. Acad. Sci USA. 1979, 76: 5939-5943.
11. Huang H.Z., Nicolich M., Linder L. Current trends in plague research: from genomics to virulence. Clin. Med. Res. 2006, 4 (3): 1189-1199.
12. Matsuura M., Takahashi H., Watanabe H. et al. Immunomodulatory properties of *Yersinia pestis* lipopolysaccharides on human macrophages. Clin. Vaccine Immunol. 2010, 17 (1): 49-55.
13. Montminy S., Khan N., McGrath S. et al. Virulence factors of *Yersinia pestis* are overcome by a strong lipopolysaccharide response. J. Nature Immun. 2006, 7 (10): 1066-1073.
14. Une T., Brubaker R. Roles of V antigen in promoting virulence and immunity in yersiniae. J. Immunol. 1984, 133: 2226-2230.

*Поступила 05.10.16*

Контактная информация: Демидова Галина Викторовна, к. б. н., 3440002, Ростов-на-Дону, ул. М. Горького, 117, р.т. (863)240-27-03