

Оригинальное исследование
<https://doi.org/10.36233/0372-9311-471>



Влияние *Yersinia pestis* с различным плазмидным составом на мембрану эритроцитов в крови морских свинок

Клюева С.Н.[✉], Бугоркова С.А., Ерохин П.С., Гончарова А.Ю., Кравцов А.Л.

Российский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора, Саратов, Россия

Аннотация

Введение. Эритроциты участвуют в развитии и реализации вакцинального и инфекционного процессов при чуме. Изменения их поверхностной архитектуры могут стать информативными критериями для доклинической оценки противочумных вакцин.

Цель работы — методом атомно-силовой микроскопии охарактеризовать состояние мембраны эритроцитов крови морских свинок в ответ на подкожное введение вакцинного штамма *Yersinia pestis* EV НИИЭГ и его изогенных производных.

Материалы и методы. Для иммунизации животных использовали *Y. pestis* EV НИИЭГ (pYT⁺, pYV⁺, pYP⁺) и его изогенные производные *Y. pestis* KM216 (pYT⁻, pYV⁻, pYP⁺), *Y. pestis* KM217 (pYT⁻, pYV⁺, pYP⁻), *Y. pestis* KM218 (pYT⁻, pYV⁻, pYP⁻). Анализ мембраны эритроцитов проводили на сканирующем зондовом микроскопе «Solver P47-PRO» («НТ-MDT»).

Результаты. Наиболее выраженные изменения поверхностной архитектоники мембраны эритроцитов морских свинок установлены в течение первых 3 сут формирования иммунного ответа в отношении штамма *Y. pestis* EV НИИЭГ и его изогенного варианта *Y. pestis* KM217, в геноме которого сохранена плазида pYV, взятых в дозе 5×10^8 КОЕ. Регистрировали значимое ($p < 0,05$) повышение доли трансформированных форм клеток ($43,67 \pm 3,63$ и $37,83 \pm 7,03\%$ против $4,08 \pm 0,86\%$ в контроле), среднеквадратичной шероховатости (319 ± 8 и 312 ± 7 нм против 70 ± 6 нм в контроле), модуля Юнга ($125,73 \pm 4,48$ и $113,8 \pm 5,41$ кПа против $53,03 \pm 1,47$ кПа в контроле). К 21-м суткам величина указанных показателей снижалась в среднем в 2,7; 2,0 и 1,5 раза соответственно, что указывало на восстановление мембраны эритроцитов.

Заключение. Установлена зависимость формирования изменений и скорость их восстановления в мембране эритроцитов от плазмидного состава штаммов *Y. pestis*. Полученные данные способствуют пониманию процессов взаимодействия *Y. pestis* с мембраной эритроцитов и могут быть использованы как дополнительные характеристики при разработке новых критериев доклинической оценки средств специфической профилактики чумы.

Ключевые слова: *Yersinia pestis*, плазмиды pYT, pYV, pYP, атомно-силовая микроскопия, эритроциты; морские свинки, трансформированные формы, среднеквадратичная шероховатость поверхности эритроцитов, модуль Юнга

Этическое утверждение. Авторы подтверждают соблюдение институциональных и национальных стандартов по использованию лабораторных животных в соответствии с «Consensus Author Guidelines for Animal Use» (IAVES, 23.07.2010). Протокол исследования одобрен на заседании Комиссии по биоэтике Российского научно-исследовательского противочумного института «Микроб» Роспотребнадзора (протокол № 3 от 15.04.2022).

Источник финансирования. Исследование выполнено при поддержке бюджетного финансирования в рамках темы НИР АААА-А21-121012090064-0.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Для цитирования: Клюева С.Н., Бугоркова С.А., Ерохин П.С., Гончарова А.Ю., Кравцов А.Л. Влияние *Yersinia pestis* с различным плазмидным составом на мембрану эритроцитов в крови морских свинок. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2024;101(3):372–382.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-471>

EDN: <https://www.elibrary.ru/jlaxvc>

Original Study Article

<https://doi.org/10.36233/0372-9311-471>

Influence of *Yersinia pestis* with different plasmid composition on the erythrocyte membrane in the blood of guinea pigs

Svetlana N. Klyueva[✉], Svetlana A. Bugorkova, Pavel S. Erokhin, Anastasiya Yu. Goncharova, Aleksandr L. Kravtsov

Russian Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov, Russia

Abstract

Introduction. Based on data on the role of blood erythrocytes in the development and implementation of the vaccine and infectious processes in plague, it was of interest to evaluate changes in erythrocyte surface architecture from the position of searching for informative criteria for the preclinical evaluation of anti-plague vaccines.

Aim — using atomic force microscopy to characterize the state of the blood erythrocyte membrane of guinea pigs in response to subcutaneous administration of the vaccine strain *Yersinia pestis* EV NIEG and its isogenic derivatives.

Materials and methods. For immunization of animals strain *Y. pestis* EV NIEG (pYT⁺, pYV⁺, pYP⁺) and its isogenic derivatives *Y. pestis* KM216 (pYT⁻, pYV⁻, pYP⁻), *Y. pestis* KM217 (pYT⁻, pYV⁺, pYP⁻), *Y. pestis* KM218 (pYT⁻, pYV⁻, pYP⁻) were used. Analysis of the erythrocyte membrane was carried out using a Solver P47-PRO scanning probe microscope (NT-MDT, Russia).

Results. The most pronounced changes in the surface architectonics of the membrane of guinea pig erythrocytes were established during the first three days of the formation of the immune response to the *Y. pestis* EV strain NIEG and its isogenic variant *Y. pestis* KM217, in the genome of which the pYV plasmid is preserved, administered at a dose of 5×10^8 CFU. A significant increase ($p < 0.05$) in the proportion of transformed cell forms ($43.67 \pm 3.63\%$ and $37.83 \pm 7.03\%$ versus $4.08 \pm 0.86\%$ in the control group), root mean square roughness (319 ± 8 nm and 312 ± 7 nm versus 70 ± 6 nm in the control group), Young's modulus (125.73 ± 4.48 kPa and 113.8 ± 5.41 kPa versus 53.03 ± 1.47 kPa in the control group). By the 21st day, the value of these indicators decreased by an average of 2.7, 2.0 and 1.5 times, respectively, indicating restoration of the erythrocyte membrane.

Conclusion. The dependence of the changes in the erythrocyte membrane and the rate of their restoration on the plasmid composition of *Y. pestis* strains has been established. The data obtained contribute to the understanding of the processes of interaction of *Y. pestis* with the erythrocyte membrane and can be used as additional characteristics in the development of new criteria for preclinical evaluation of plague candidate vaccines.

Keywords: *Yersinia pestis*, plasmids pYT, pYV, pYP, atomic force microscopy, guinea pig; red blood cells, transformed forms, root mean square roughness of the erythrocyte surface, Young's modulus

Ethics approval. The authors confirm compliance with institutional and national standards for the use of laboratory animals in accordance with the Consensus Author Guidelines for Animal Use (IAVES, 07/23/2010). The study protocol was approved at a meeting of the Bioethics Commission of the FKUN Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe" of Rospotrebnadzor (protocol No. 3 of 04/15/2022).

Funding source. The study was supported by budget funding within the framework of the research topic No AAAA-A21-121012090064-0.

Conflict of interest. The authors declare no apparent or potential conflicts of interest related to the publication of this article.

For citation: Klyueva S.N., Bugorkova S.A., Erokhin P.S., Goncharova A.Yu., Kravtsov A.L. Influence of *Yersinia pestis* with different plasmid composition on the erythrocyte membrane in the blood of guinea pigs. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology*. 2024;101(3):372–382.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-471>

EDN: <https://www.elibrary.ru/jlaxvc>

Введение

В настоящее время сохраняется необходимость как в совершенствовании имеющихся средств иммунопрофилактики чумы, так и в разработке эффективных и безопасных новых препаратов, в том числе вакцин нового поколения, созданных на основе авирулентных штаммов *Yersinia pestis* с чётко контролируемыми генетическими дефектами [1, 2]. Наиболее сложной является доклиническая оценка вакцин, поскольку от информативности и адекватности используемых методов исследования на этом этапе будет зависеть качество готового препарата.

Основным индикатором, отражающим любые сдвиги в состоянии организма, является кровь, в составе которой одной из активно тестируемых клеточных групп являются эритроциты [3]. Эритроциты наряду с лейкоцитами и тромбоцитами включены в категорию защитных клеток, способных убивать бактерии, и являются участниками и

регуляторами реакций воспаления и врождённого иммунитета [4]. Эритроцитарные мембраны представляют собой твердоупругий белковый каркас, ячейки которого заполнены липидным бислоем [5]. Белковый каркас обладает высокой эластичностью и обуславливает вязкоупругие свойства интактных мембран. Плазмолемма эритроцитов содержит не менее 100 различных белков, формирующих цитоскелетный каркас, который придает эритроциту характерную двояковогнутую форму. Доказано, что отличие формы эритроцитов от нормальной двояковогнутой является показателем патологического процесса [6]. Изучена роль эритроцитов крови человека в процессах модуляции пролиферации и выживания Т-клеток посредством усиления секреции ряда цитокинов, индукции рецепторов интерлейкина-2 и регуляции соотношения CD4⁺/CD8⁺ [7–9]. Именно поэтому представляет интерес изучение поверхностной структуры эритроцита, являющегося своеобразной клеточной тест-системой при

различных физиологических, постинфекционных и поствакцинальных процессах.

Наиболее эффективным методом изучения состояния поверхностных мембран является атомно-силовая микроскопия (АСМ) [10, 11], применяемая для оценки таких трехмерных параметров, как толщина (высота), объём, среднеквадратичная шероховатость поверхности, позволяющих характеризовать функциональное состояние клеток. Анализ силовых кривых по результатам АСМ направлен на количественное определение механических параметров: деформации, жесткости, модуля Юнга (МЮ) (важный количественный параметр, от которого существенно зависят реологические свойства крови, её текучесть по капиллярному руслу) [6, 12].

Экспериментально показано, что от плазмидного профиля изогенных производных вакцинного штамма чумного микроба зависит их иммуногенность [13], поэтому для поиска информативных критериев доклинической оценки живых чумных вакцин представляет интерес детализация процессов взаимодействия штаммов с различным плазмидным составом с эритроцитами крови.

Цель работы — методом АСМ охарактеризовать состояние мембраны эритроцитов в крови морских свинок в ответ на подкожное введение вакцинного штамма *Y. pestis* EV НИИЭГ и его изогенных производных.

Материалы и методы

Исследования проводили с вакцинным штаммом *Y. pestis* EV НИИЭГ (pYT⁺, pYV⁺, pYP⁺) и его изогенными производными *Y. pestis* KM 216 (pYT⁻, pYV⁻, pYP⁺), *Y. pestis* KM 217 (pYT⁻, pYV⁺, pYP⁻), *Y. pestis* KM 218 (pYT⁻, pYV⁻, pYP⁻), полученными из Государственной коллекции патогенных бактерий при Российском противочумном институте «Микроб». Штаммы *Y. pestis* выращивали на агаре LB (рН 7,2) в течение 48 ч при 28°C. Животных иммунизировали указанными штаммами *Y. pestis* в концентрациях 5×10^8 КОЕ и 5×10^5 КОЕ.

В качестве биомодели были выбраны морские свинки массой 35–400 г, полученные из питомника при Российском противочумном институте «Микроб». Из животных (50 особей) были сформированы 8 опытных групп по 6 особей в каждой и контрольная группа — интактные морские свинки (2 особи). Все манипуляции с животными проводили в соответствии с законодательством Российской Федерации¹ и международными принципами². Программа экспериментальной работы с животными

одобрена Комиссией по биоэтике при Российском противочумном институте «Микроб» (протокол № 3 от 15.04.2022).

На 1, 3 и 21-е сутки после иммунизации у морских свинок забирали кровь из ушной вены. Оценку состояния клеток проводили с помощью микроскопа «Olympus CX41» («Olympus») и цифровой камеры «VZ-C31S» («VideoZavt») в программе «VideoZavt v. 1.5». Подсчёт эритроцитов с характеристикой морфологии выполняли в 5 полях зрения, учитывая не менее 800 клеток.

Для АСМ кровь животных собирали в пробирки с 2,5% раствором глутаральдегида в соотношении 1 : 3 и фиксировали в течение 2,5 ч в соответствии с методическими указаниями МУ 1.3.3103-13 «Организация работы лабораторий, использующих методы электронной и атомно-силовой микроскопии при исследовании культур микроорганизмов I–IV групп патогенности». Эритроциты осаждали центрифугированием при 1500 оборотах в течение 5 мин. Клетки дважды отмывали фосфатным буфером рН 7,4 при тех же условиях центрифугирования. Полученную взвесь клеток путём десятикратного разведения дистиллированной водой доводили до концентрации 3×10^6 клеток/л. Контроль абсолютного количества клеток в конечной пробе осуществляли подсчётом эритроцитов в камере Горяева, применяя световую микроскопию (увеличение $\times 400$).

Анализ проб осуществляли на сканирующем зондовом микроскопе «Solver P47-PRO» («NT-MDT») [10] в режиме прерывистого и непрерывного контакта с использованием кремниевых кантилеров «NSG01» («NT-MDT»); резонансная частота 120 кГц, константа жесткости 5,5 Н/м) и «CSG10» («NT-MDT»); резонансная частота 20 кГц, константа жесткости 0,1 Н/м) соответственно. Для обработки АСМ-изображений использовали программу «Nova» («NT-MDT»), позволяющую редактировать полученные АСМ-изображения, а также представлять их в трехмерном формате. На полях сканирования от 15×15 до 50×50 мкм² анализу подвергали поверхность отдельно лежащих эритроцитов. Визуализация результатов измерения состояла в представлении рельефа в виде топографической карты и трёхмерных изображений. На топографических картах проводили сечения, вдоль которых строили профиль поверхности и выполняли расчёт среднеквадратичной шероховатости мембран эритроцитов (Rq).

На каждом препарате в случайном порядке выбирали 10 эритроцитов, на мембране которых в 9 точках исследовали упругость мембраны с построением графика силовых кривых и с дальнейшим вычислением среднего арифметического значения МЮ по каждой сканированной клетке. МЮ применяли для оценки жёсткости мембран эритроцитов на основе модели Герца, описывающей упругую деформацию двух контактирующих тел [12]:

¹ Приказ Минздрава России от 01.04.2016 № 199Н «Об утверждении Правил надлежащей лабораторной практики».

² Директива Европейского парламента и Совета Европейского Союза от 22.09.2010 № 2010/63/EU о защите животных, используемых в научных целях.

$$F = \frac{4}{3} \times E \times R^{0.5} \times h^{1.5},$$

где F — сила, действующая на образец; E — МЮ; R — радиус зонда; h — глубина прогиба мембраны. С учётом радиуса закругления кантилеверов, которые использовали в данном исследовании, выводили формулу определения МЮ (кПа):

$$E = \frac{3}{4} \times F/R^{0.5} \times h^{1.5}.$$

Статистическую обработку полученных результатов осуществляли с помощью стандартного пакета программ «Microsoft Office Excel 2016», «Statistica v. 10.0» («StatSoft Inc.»). Взаимосвязь между переменными определяли с помощью рангового корреляционного анализа по Спирмену. Корреляционную связь считали сильной при коэффициенте корреляции $r = 0,7-1,0$, умеренной (средней) силы — при $r = 0,3-0,7$, слабой — при $r = 0-0,3$, характер связи (прямая, обратная) определяли по знаку (+; -) перед значением. Корреляционную связь считали достоверной при $p < 0,05$. Достоверность различий сравниваемых величин оценивали с помощью парного t -критерия Стьюдента. Данные представляли в виде $M \pm m$, где M — среднее арифметическое значение, m — ошибка среднего арифметического.

Результаты

Эритроциты интактных морских свинок при наблюдении в световом микроскопе в стандартном режиме светлого поля представляли собой оптически контрастные объекты округлой формы (рис. 1, а). В ответ на иммунизацию морских свинок штаммами *Y. pestis* в крови происходило изме-

нение формы и размеров эритроцитов, появлялись эритроциты трансформированной формы (эхиноциты (рис. 1, б), сфероциты, кодоциты).

Методом АСМ установлено, что в крови интактных морских свинок абсолютное большинство эритроцитов (до 96%) было представлено двояковогнутыми дискоцитами (рис. 2, а), с гладкой поверхностью, с утолщениями по краям (тор) и центральной впадиной (пеллор). Средний диаметр клетки составлял $6,0 \pm 0,2$ мкм, что укладывается в диапазон значений диаметра нормальных эритроцитов у данного вида лабораторных животных ($4,3-7,0$ мкм) [14]. По данным АСМ, высота тора дискоцитов не превышала $1,3 \pm 0,1$ мкм, а глубина впадины — $0,47 \pm 0,04$ мкм (рис. 3, а).

Атипичные формы клеток, которые появлялись в результате воздействия штаммов *Y. pestis*, — это эхиноциты (рис. 2, б, в), сфероциты (рис. 2, б), кодоциты (рис. 2, г) и плоские клетки. Анализ гистограмм нормальных эритроцитов и трансформированных форм (ТФ) показал, что у неизменённых форм типичный двояковогнутый профиль клетки на кривой сечения представлен двумя равномерными синусоидами (рис. 3, а), в то время как у ТФ были выявлены выраженные изменения структуры мембранной поверхности. Любое нарушение в рельефе эритроцита отражалось на изменении профиля клетки, представленного в гистограммах (рис. 3, б-г).

Среди изменённых форм эритроцитов большинство ($65,2 \pm 2,6\%$) приходилось на долю эхиноцитов с единичными и множественными выростами толщиной 220 ± 30 нм, равномерно распределёнными на поверхности клетки (рис. 3, б). На долю ко-

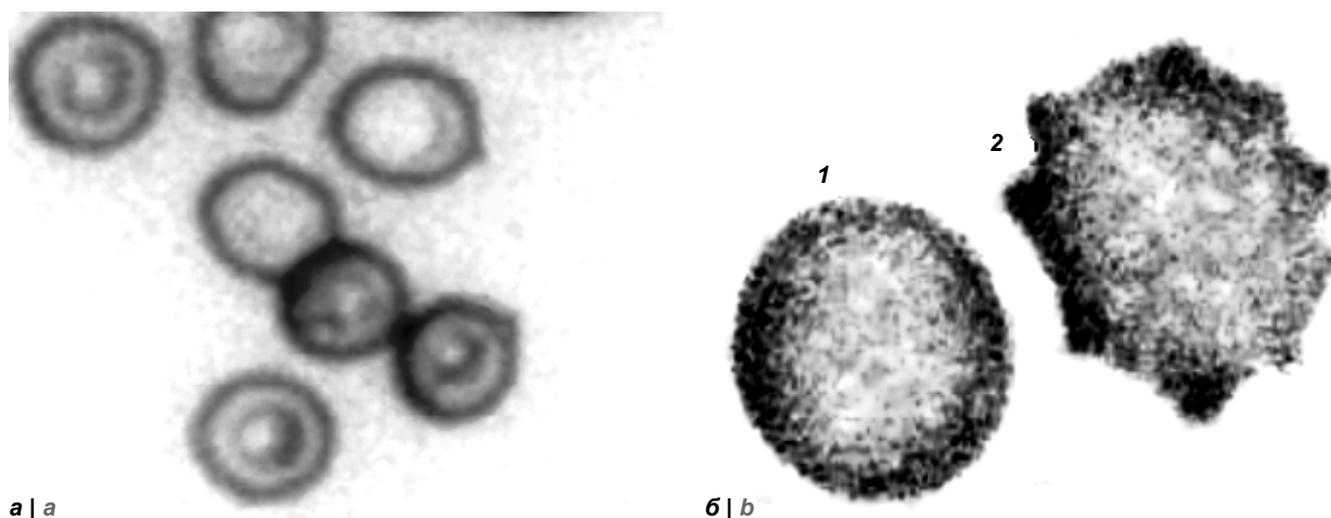


Рис. 1. Эритроциты морской свинки (световая микроскопия без окраски).

а — эритроциты интактной морской свинки ($\times 400$); б — эритроциты морской свинки, иммунизированной *Y. pestis* EV НИИЭГ ($\times 1000$):

1 — дискоцит; 2 — эхиноцит.

Fig. 1. Guinea pig erythrocytes (light microscopy without staining).

а — intact guinea pig erythrocytes ($\times 400$); б — guinea pig erythrocytes immunized with *Y. pestis* EV NIEG ($\times 1000$): 1 — discocyte; 2 — echinocyte.

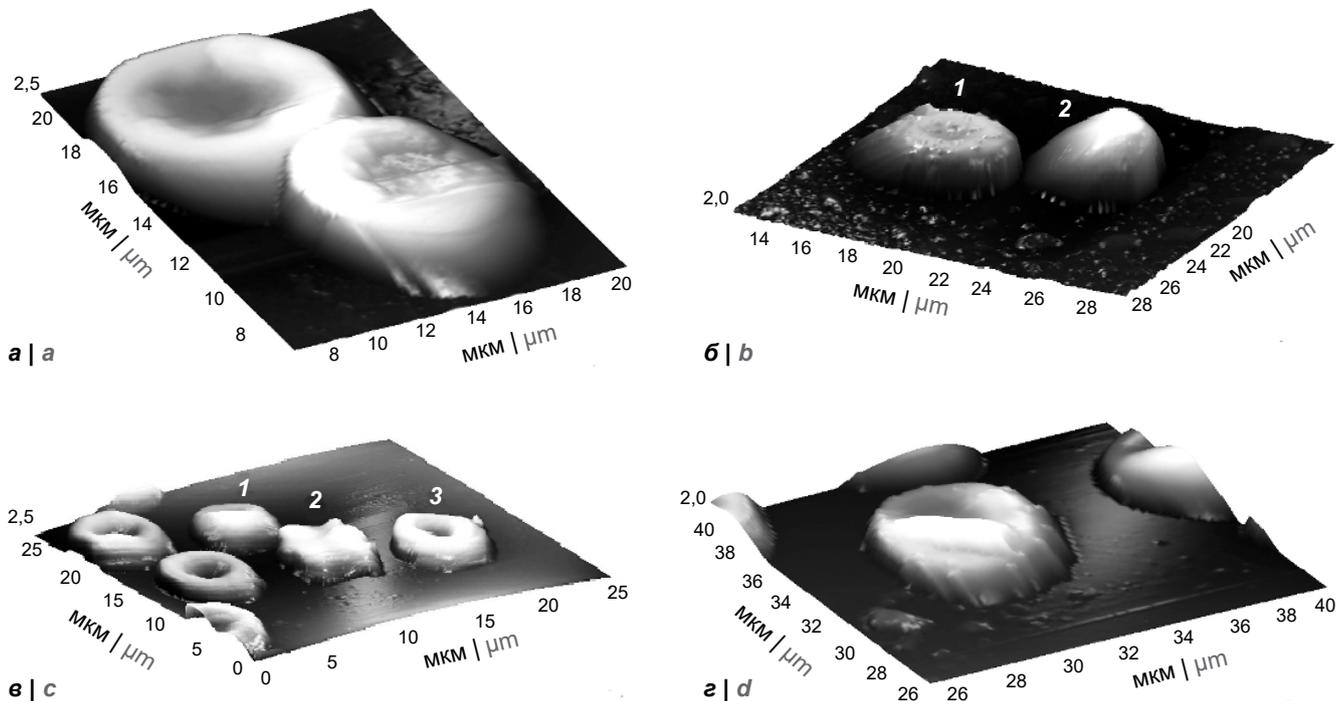


Рис. 2. Трёхмерные АСМ-изображения эритроцитов морской свинки, иммунизированной *Y. pestis* EV НИИЭГ.

a — дискоциты, $20 \times 20 \mu\text{m}^2$; **б:** 1 — эхиноцит, 2 — сфероцит, $15 \times 15 \mu\text{m}^2$; **в:** 1 — кодоцит, 2 — эхиноцит, 3 — дискоцит, $25 \times 25 \mu\text{m}^2$; **г** — кодоцит, $15 \times 15 \mu\text{m}^2$.

Fig. 2. 3D AFM images of erythrocytes from a guinea pig immunized with *Y. pestis* EV NIIЭГ.

a — discocytes, $20 \times 20 \mu\text{m}^2$; **b:** 1 — echinocyte, 2 — spherocyte, $15 \times 15 \mu\text{m}^2$; **c:** 1 — codocyte, 2 — echinocyte, 3 — discocyte, $25 \times 25 \mu\text{m}^2$; **d** — codocyte, $15 \times 15 \mu\text{m}^2$.

доцитов (в середине клетки находится не пэллор, а выпуклость или мишень — утолщение, в котором скапливается гемоглобин) и сфероцитов (эритроциты, имеющие неправильную, сферическую форму) приходилось $32,4 \pm 1,2\%$. Диаметр мишени кодоцитов не превышал $3,0 \pm 0,5 \mu\text{m}$, что составляет почти 40% диаметра клетки (рис. 3, в). Высота мишеневидной структуры составляла $0,70 \pm 0,01 \mu\text{m}$, что в 1,7 раза меньше высоты остальной части клетки ($1,2 \pm 0,1 \mu\text{m}$). Профиль сфероцита имел вид купола высотой $2,5 \pm 0,2 \mu\text{m}$ и диаметром $6,0 \pm 0,3 \mu\text{m}$ (рис. 3, г). Плоские клетки, на долю которых приходилось всего $2,0 \pm 0,5\%$, представляли собой диски с гладкой ровной поверхностью диаметром $7,5 \pm 0,5 \mu\text{m}$ и толщиной $0,40 \pm 0,05 \mu\text{m}$, без углубления в центре.

Анализ результатов АСМ эритроцитов в опытных группах позволил количественно сравнить степень и характер воздействия вакцинного штамма *Y. pestis* EV и его изогенных производных на поверхностную структуру эритроцитов в крови морских свинок (табл. 1). Наиболее значимые различия, характеризующиеся повышением (в среднем в 8,6 раза) ТФ эритроцитов по сравнению с контролем ($p < 0,05$), установлены в течение первых 3 сут в отношении штаммов *Y. pestis* EV НИИЭГ и *Y. pestis* KM 217, общим для которых является наличие в составе плазмиды pYV (45 мДа), с наличием которой

связывают клеточную адгезию, аутоагглютинацию, поверхностную агглютинацию, а также синтез белков наружной мембраны, в том числе V- и W-антигенов и других белков, действие которых направлено на подавление фагоцитарной активности клеток иммунной системы, а следовательно, обеспечение лучшей приживаемости вакцинных штаммов. К 21-м суткам количество ТФ эритроцитов в этих группах достоверно снижалось в среднем в 2,8 раза ($p < 0,05$) по сравнению с 1-ми сутками, но продолжало в среднем в 3 раза превышать аналогичный показатель в группе интактного контроля. Следует отметить влияние дозы *Y. pestis* EV НИИЭГ на количество ТФ эритроцитов на 3-и сутки иммуногенеза. Так, применение *Y. pestis* EV НИИЭГ в высокой дозе (5×10^8 КОЕ) вызывало увеличение ТФ в 1,5 раза ($p < 0,05$) больше, чем на введение низкой дозы (5×10^5 КОЕ). Количество ТФ в ответ на иммунизацию *Y. pestis* KM 216 — штаммом, в составе которого имелась лишь одна плазида рУР, детерминирующая синтез бактериоцина (пестицин 1) и активатора плазминогена, впрочем, как и на введение штамма *Y. pestis* KM 218, лишённого всех 3 ключевых плазмид чумного микроба, увеличивалось на 1-е и 3-и сутки в среднем в 3,6 раза по сравнению с аналогичным показателем в интактном контроле, но на 21-е сутки достоверного отличия по этому показателю от интактного контроля не выявлено.

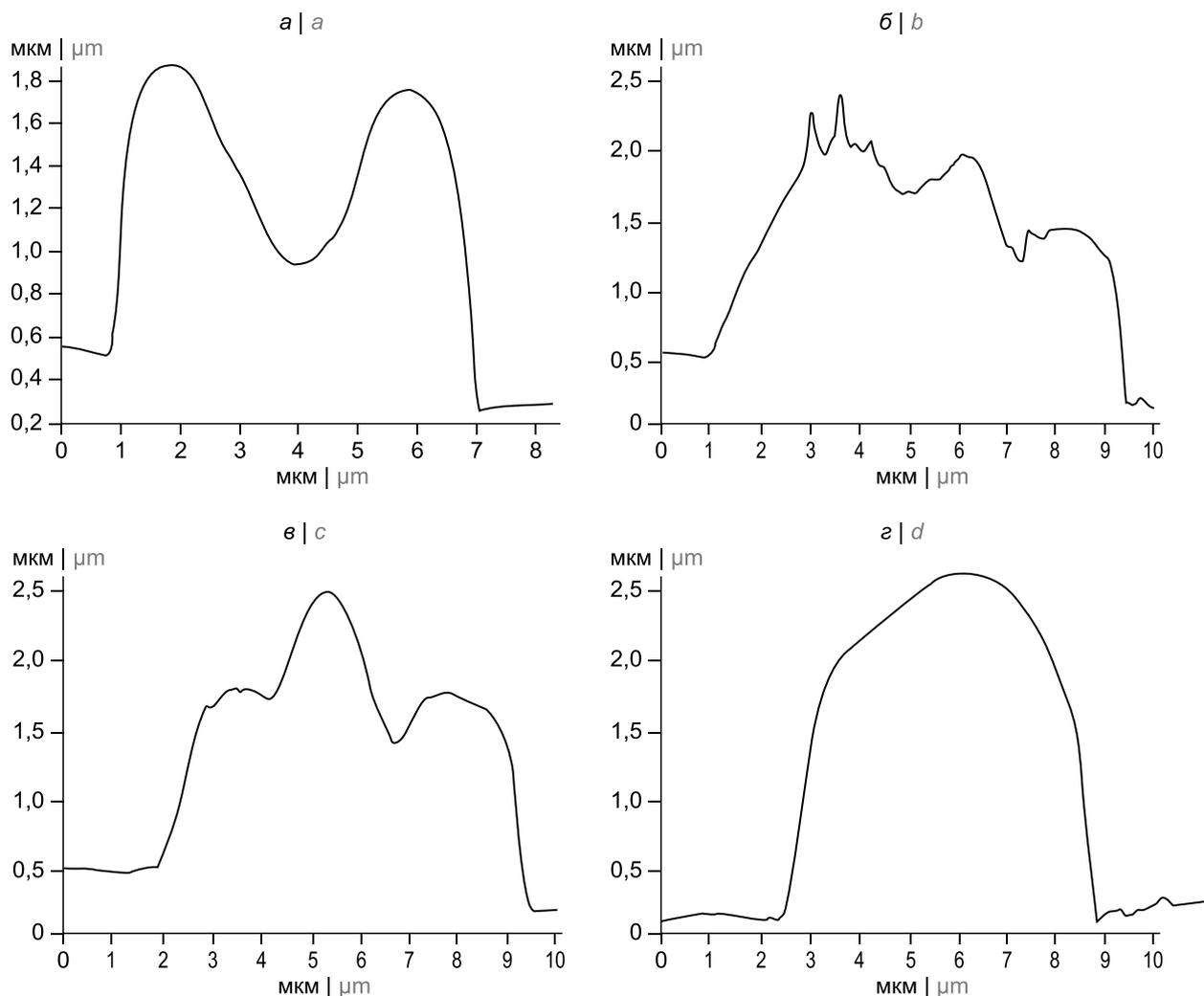


Рис. 3. Профили различных форм эритроцитов морской свинки, иммунизированной *Y. pestis* KM 217.

a — дискоцит; *b* — эхиноцит; *c* — кодоцит; *d* — сфероцит.

Fig. 3. Profiles of various forms of erythrocytes from a guinea pig immunized with *Y. pestis* KM 217.

a — discocyte; *b* — echinocyte; *c* — codocyte; *d* — spherocyte.

Таблица 1. Количество трансформированных форм эритроцитов в ответ на иммунизацию морских свинок штаммами *Y. pestis* с различной изогенной структурой по данным АСМ

Table 1. The number of transformed forms of erythrocytes in response to immunization of guinea pigs with *Y. pestis* strains with different isogenic structures according to AFM data

Штамм Strain	Группа Group	Иммунизирующая доза, КОЕ Immunizing dose, CFU	Количество клеток, % Number of cells, %		
			1-е сутки 1 st day	3-и сутки 3 rd day	21-е сутки 21 st day
<i>Y. pestis</i> EV НИИЭГ	1	5×10^5	$28,71 \pm 6,24^*$	$28,09 \pm 3,83^{**}$	$11,43 \pm 1,47^{*o}$
	2	5×10^8	$37,5 \pm 5,07^*$	$43,67 \pm 3,63^{**}$	$15,15 \pm 2,02^{*3}$
<i>Y. pestis</i> KM 216	3	5×10^5	$13,57 \pm 4,13^*$	$17,66 \pm 3,48^*$	$8,0 \pm 2,12$
	4	5×10^8	$18,33 \pm 4,26^*$	$20,77 \pm 4,54^*$	$9,17 \pm 3,29$
<i>Y. pestis</i> KM 217	5	5×10^5	$34,45 \pm 5,23^*$	$35,47 \pm 6,85^*$	$10,65 \pm 2,56^{*o}$
	6	5×10^8	$36,15 \pm 6,07^*$	$37,83 \pm 7,03^*$	$14,58 \pm 4,84^{*o}$
<i>Y. pestis</i> KM 218	7	5×10^5	$11,89 \pm 3,71^*$	$16,71 \pm 2,72^*$	$6,29 \pm 2,87$
	8	5×10^8	$16,85 \pm 2,74^*$	$19,65 \pm 3,27^*$	$9,09 \pm 2,3$
Контроль Control	9	—		$4,08 \pm 0,86$	

Примечание. Здесь и в табл. 2: * $p < 0,05$ по сравнению с контролем; ** $p < 0,05$ различия между дозами; $^o p < 0,05$ по сравнению с 1-ми сутками.

Note. Here and in the Table 2: * $p < 0.05$ compared with control; ** $p < 0.05$ differences: between doses; $^o p < 0.05$ compared with 1st day.

В дальнейших исследованиях с целью характеристики клеточной поверхности был использован параметр функциональных изменений рельефа эритроцита — Rq [10]. В течение первых 3 сут показатель Rq мембран эритроцитов всех иммунных морских свинок достоверно превышал ($p < 0,05$) соответствующее значение в контроле (табл. 2). Наиболее значимые различия в значениях Rq установлены в отношении *Y. pestis* EV НИИЭГ (pYT⁺, pYV⁺, pYP⁺) и *Y. pestis* KM 217 (pYV⁺) в зависимости от дозы во все сроки иммунного ответа. Так, при использовании вышеперечисленных штаммов в высокой дозе (5×10^8 КОЕ) величина Rq в среднем в 1,7 раза превышала ($p < 0,05$) соответствующие величины при низкой дозе (5×10^5 КОЕ). На 21-е сутки зарегистрировано статистически значимое снижение показателя Rq при иммунизации животных штаммами *Y. pestis* EV НИИЭГ (pYT⁺, pYV⁺, pYP⁺), *Y. pestis* KM 216 (pYP⁺), *Y. pestis* KM 217 (pYV⁺) в обеих дозах по сравнению с аналогичными показателями на 1-е сутки иммунного ответа ($p < 0,05$).

Деформационную способность эритроцитов морских свинок оценивали с помощью МЮ. Средние значения МЮ во всех опытных группах на протяжении с 3-х по 21-е сутки превосходили контрольный показатель (табл. 2). Наибольшие значения МЮ регистрировали на 3-и сутки иммуногенеза при иммунизации *Y. pestis* EV НИИЭГ, особенно при инокуляции вакцинного штамма в дозе 5×10^8 КОЕ по сравнению с 1-ми сутками и контролем ($p < 0,05$). В случае применения штамма *Y. pestis* KM 216 (pYP⁺) в дозе 5×10^5 КОЕ к 21-м суткам иммуногенеза величина МЮ достоверно превышала значения 1-х суток ($p < 0,05$). При использова-

нии бесплазмидного штамма *Y. pestis* KM 218 (7-я и 8-я группы) показатель МЮ оставался на уровне 1-х суток. И, наоборот, при иммунизации морских свинок штаммами *Y. pestis* EV НИИЭГ, содержащего 3-и основные плазмиды (1-я и 2-я группы) и *Y. pestis* KM 217 (pYV⁺) (5-я и 6-я группы), величина МЮ достоверно снижалась ($p < 0,05$) по сравнению с показателями, установленными в 1-е сутки.

Далее был проведён корреляционный анализ зависимости параметров, характеризующих поверхностную архитектуру мембраны эритроцитов (ТФ, Rq, МЮ), от плазмидного состава штаммов *Y. pestis*. В результате выявлена прямая умеренной силы связь между показателем Rq и наличием у штамма *Y. pestis* плазмиды pYV и/или pYP ($r = 0,5$; $p = 0,04$).

Обсуждение

В результате проведённого исследования наглядно продемонстрировано вовлечение эритроцитов крови морских свинок в процессы взаимодействия со штаммами *Y. pestis*, характер которого зависел от их плазмидного состава. Результатом такого взаимодействия было формирование ряда структурных преобразований мембраны клетки макроорганизма и, следовательно, изменение её функции. По нашим данным, большинство трансформированных форм эритроцитов составляли эхиноциты ($65,2 \pm 2,6\%$), а также кодоциты и сфероциты ($32,4 \pm 1,2\%$). Всего $2,0 \pm 0,5\%$ эритроцитов приходилось на долю плоских клеток, которые, по данным литературы [15], вероятнее всего, являются разновидностью молодых форм эритроцитов.

Основные изменения поверхностной архитектуры эритроцитов происходили в течение первых

Таблица 2. Динамика изменения АСМ-параметров поверхности эритроцитов морских свинок в ответ на иммунизацию морских свинок штаммами *Y. pestis* с различной изогенной структурой по данным АСМ

Table 2. Dynamics of changes in AFM parameters of the surface of guinea pig erythrocytes in response to immunization of guinea pigs with *Y. pestis* strains with different isogenic structures according to AFM data

Группа Group	Штамм Strain	Иммуни- зирующая доза, КОЕ Immunizing dose, CFU	АСМ-параметры AFM parameters					
			1-е сутки 1 st day		3-и сутки 3 rd day		21-е сутки 21 st day	
			Rq, нм Rq, nm	МЮ, кПа MU, kPa	Rq, нм Rq, nm	МЮ, кПа MU, kPa	Rq, нм Rq, nm	МЮ, кПа MU, kPa
Контроль Control		—	70 ± 6	53,03 ± 1,47	72 ± 6	54,03 ± 1,79	68 ± 6	52,03 ± 1,62
1	<i>Y. pestis</i> EV НИИЭГ	5×10^5	131 ± 7**	95,25 ± 2,86**	137 ± 6**	125,00 ± 3,75**°	111 ± 7**°	61,14 ± 2,46**°
2	<i>Y. pestis</i> EV НИИЭГ	5×10^8	319 ± 8**	125,73 ± 4,48**	183 ± 7**°	142,58 ± 5,98**°	150 ± 8**°	77,92 ± 3,73**°
3	<i>Y. pestis</i> KM 216	5×10^5	129 ± 8*	62,28 ± 2,87	179 ± 9*°	70,02 ± 2,76*	101 ± 8*°	80,27 ± 2,76*°
4	<i>Y. pestis</i> KM 216	5×10^8	153 ± 9*	72,11 ± 2,16*	203 ± 9*°	80,08 ± 3,73*	110 ± 9*°	76,98 ± 3,82*
5	<i>Y. pestis</i> KM 217	5×10^5	228 ± 7**	101,13 ± 3,04*	201 ± 7**°	76,14 ± 2,28*°	88 ± 5**°	80,60 ± 2,42*°
6	<i>Y. pestis</i> KM 217	5×10^8	312 ± 7**	113,80 ± 5,41*	280 ± 8**°	81,61 ± 2,45*°	164 ± 6**°	84,41 ± 2,53*°
7	<i>Y. pestis</i> KM 218	5×10^5	90 ± 5	65,80 ± 1,98*	101 ± 4*	71,22 ± 2,32*	71 ± 5*	68,52 ± 2,29*
8	<i>Y. pestis</i> KM 218	5×10^8	110 ± 10*	74,70 ± 2,24*	111 ± 6*	80,37 ± 2,47*°	104 ± 6**	77,55 ± 2,51*

3 сут после введения вакцинного штамма и его изогенных производных, что укладывается в рамки, предусмотренные развитием нестерильной фазы иммунитета, сопряжённой с активным размножением бактерий в месте введения, регионарных лимфатических узлах и во внутренних органах (селезёнка, печень, лёгкие) [16]. Степень выраженности этих изменений зависела от плазмидного состава штаммов, взятых в исследование, и их иммунизирующей дозы. Эти данные согласуются с ранее полученной информацией о различной способности вакцинного штамма *Y. pestis* EV НИИЭГ и его изогенных производных индуцировать на 1-е сутки иммуногенеза секреторную дегрануляцию нейтрофилов крови морских свинок с высвобождением во внеклеточное пространство лейкоцитарной эластазы [17], которая, вызывая деструкцию белкового каркаса эритроцитов [18], может индуцировать появление в крови большого количества эхиноцитов и других морфологически изменённых форм эритроцитов [19].

В первые 3 сут иммунного ответа максимальное количество трансформированных эритроцитов обнаружено в ответ на иммунизацию полноценным по плазмидному составу штаммом *Y. pestis* EV НИИЭГ (pYT⁺, pYV⁺, pYP⁺) и моноплазмидным штаммом *Y. pestis* KM 217, содержащим плазмиду pYV, кодирующую белки системы секреции III типа (T3SS), эффекторные белки Yops (YopE, YopH, YopM, YopP, YopT, YopO) и регуляторные белки [20]. С одной стороны, эффекторные белки Yops эффективно активизируют патогенные виды иерсиний для подавления врождённого иммунного ответа хозяина путём регуляции запрограммированной гибели клеток, а также для ингибирования фагоцитоза и продукции ряда провоспалительных цитокинов [21], нарушая актиновый цитоскелет клеток хозяина, а с другой — поверхностно расположенные белки внешней мембраны (Yops), кодируемые плазмидой pYV *Y. pestis*, являются наиболее перспективными мишенями для иммунопрофилактики и иммунотерапии чумы [22].

Известно, что плазмиды pYV является генетическим элементом, имеющим решающее значение для патогенности, ответственной за мощную инвазивную способность возбудителя чумы *Y. pestis* и его геморрагические свойства [23]. Попадая в кровь, штамм *Y. pestis* EV НИИЭГ вступает во взаимодействие с эритроцитами крови. Так, ранее в экспериментах как *in vivo*, так и *in vitro* была обнаружена способность штаммов *Y. pestis*, независимо от их фенотипа, сопряжённого с пигментацией (Pgm⁺/Pgm⁻), и плазмидного профиля, проникать внутрь эритроцитов человека и мыши и разрушать их мембрану [24]. Кроме того, штамм *Y. pestis* EV НИИЭГ обладает выраженными адгезивными свойствами к эритроцитам человека в результате гидрофобных взаимодействий, которые обусловлены поверхностными структурами микробных клеток, относящи-

мися к липопротеидам [25], что обуславливает его влияние на мембрану клетки.

Наименьшее количество трансформированных эритроцитов обнаружено в ответ на иммунизацию моноплазмидным штаммом *Y. pestis* KM216, содержащим только плазмиду пестициногенности pYP, и бесплазмидным штаммом *Y. pestis* KM 218, что сопряжено с их низкой иммуногенностью на фоне слабой приживаемости в макроорганизме [13]. К тому же штаммы чумного микроба, отличающиеся по плазмидному профилю, в частности, отсутствию плазмид (pYP, pYV), обладают низкой адгезивной активностью к эритроцитам и легко поглощаются фагоцитами при введении лабораторным животным [26].

В нашем исследовании выявлено изменение прогиба мембраны эритроцита при взаимодействии клеток с *Y. pestis*, обусловленное изменением упругих свойств мембраны, имеющим место в 1-е сутки иммуногенеза, и постепенно проходящее к 21-м суткам наблюдения [27]. Изменение величины прогиба мембраны сопряжено с нарушением её формы, когда уменьшается островеершинность края эритроцита, пропадает линейный участок между центром эритроцита и его краем, координаты максимума на срезе мембраны становятся размытыми, а если прогиб исчезает полностью, то поверхность мембраны становится выпуклой, что сказывается на процессах микроциркуляции в тканях.

Ещё одним параметром, используемым для анализа АСМ-изображений поверхности клеток, является шероховатость, показывающая отклонение рельефа клеточной поверхности от среднего значения. Наиболее выраженное воздействие на величину среднеквадратичной шероховатости поверхности (Rq) эритроцитов в крови морских свинок оказывал штамм *Y. pestis* EV НИИЭГ (pYT⁺, pYV⁺, pYP⁺) и его изогенный вариант *Y. pestis* KM 217 (pYV⁺) при применении в высокой дозе (5×10^8 КОЕ). Согласно результатам ряда исследований, повышение величины Rq обусловлено образованием выпячиваний интегральных белков из липидного бислоя мембраны эритроцита [28, 29], косвенным свидетельством чего является активация процессов перекисного окисления липидов [30]. В этой связи выявленная корреляционная связь между наличием плазмиды pYV и pYP у изученных штаммов чумного микроба и показателем Rq, по-видимому, объясняется повышенной адгезивной способностью штаммов, содержащих pYV и pYP [26], и укладывается в ранее описанную динамику изменения поверхностной архитектоники эритроцитов на живые вакцины в различные сроки после иммунизации биомодели [3].

Установленное нами достоверное повышение МЮ на 3-и сутки иммуногенеза под влиянием полноплазмидного штамма *Y. pestis* EV НИИЭГ является свидетельством снижения эластичности и вязкости

клеточной мембраны и повышения её жёсткости [31]. Однако на момент формирования иммунного ответа в стерильной фазе иммунитета (21-е сутки) этот показатель существенно снижался, что указывает на восстановление параметров клеточной мембраны эритроцитов (повышение эластичности и увеличение вязкости при одновременном снижении жёсткости клеточной мембраны эритроцита).

Происходящие в первые 3 сут после иммунизации полноплазмидным вакцинным штаммом *Y. pestis* EV структурные изменения в мембране эритроцитов морских свинок сопряжены с высокой способностью этого штамма приживаться в клетках и тканях макроорганизма, следствием чего является его высокая иммуногенность. Это согласуется с результатами исследования сравнительной иммуногенности вакцинного штамма *Y. pestis* EV НИИЭГ и его изогенных производных, продемонстрировавшего прямую зависимость этого показателя от наличия рУТ, рУV и рУР [13].

Таким образом, полученные данные, иллюстрирующие динамику изменения поверхностной архитектоники мембраны эритроцитов в процессе иммуногенеза в ответ на вакцинный штамм чумного микроба и его изогенные производные, не только способствуют пониманию отдельных этапов взаимодействия микро- и макроорганизма, но могут быть использованы как дополнительные характеристики при разработке новых информативных критериев доклинической оценки средств специфической профилактики чумы.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ | REFERENCES

- Byvalov A.A., Konyshev I.V., Uversky V.N., et al. *Yersinia* outer membrane vesicles as potential vaccine candidates in protecting against plague. *Biomolecules*. 2020;10(12):1694. DOI: <https://doi.org/10.3390/biom10121694>
- Cote C.K., Biryukov S.S., Klimko C.P., et al. Protection elicited by attenuated live *Yersinia pestis* vaccine strains against lethal infection with virulent *Y. pestis*. *Vaccines (Basel)*. 2021;9(2):161. DOI: <https://doi.org/10.3390/vaccines9020161>
- Бугоркова С.А., Ключева С.Н. Топографическая характеристика состояния мембран эритроцитов крови при экспериментальном вакцинном процессе. *Морфологические ведомости*. 2015;(2):21–7. Bugorkova S.A., Klyueva S.N. Topographical features state of erythrocyte membranes blood experimental vaccines process. *Morphological Newsletter*. 2015;(2):21–7. EDN: <https://elibrary.ru/vkztiv>
- Серебряная Н.Б., Якуцени П.П. Эритроциты как бактерицидные клетки, участники и регуляторы воспаления. *Иммунология*. 2020;41(5):458–69. Serebryanaya N.B., Yakutseni P.P. Red blood cells as bactericidal cells, participants and regulators of inflammation. *Immunology*. 2020;41(5):458–69. DOI: <https://doi.org/10.33029/0206-4952-2020-41-5-458-469> EDN: <https://elibrary.ru/ipqyca>
- Li H., Lykotraftitis G. Erythrocyte membrane model with explicit description of the lipid bilayer and the spectrin network. *Biophys. J.* 2014;107(3):642–53. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2014.06.031>
- Spyratou E., Dilvoi M., Patatoukas G., et al. Probing the effects of ionizing radiation on young's modulus of human erythrocytes cytoskeleton using atomic force microscopy. *J. Med. Phys.* 2019;44(2):113–7. DOI: https://doi.org/10.4103/jmp.JMP_95_18
- Fonseca A.M., Pereira C.F., Porto G., Arosa F.A. Red blood cells promote survival and cell cycle progression of human peripheral blood T cells independently of CD58/LFA-3 and heme compounds. *Cell. Immunol.* 2003;224(1):17–28. DOI: [https://doi.org/10.1016/s0008-8749\(03\)00170-9](https://doi.org/10.1016/s0008-8749(03)00170-9)
- Porto B., Fonseca A.M., Godinho I., et al. Human red blood cells have an enhancing effect on the relative expansion of CD8⁺ T-lymphocytes *in vitro*. *Cell Prolif.* 2001;34(6):359–67. DOI: <https://doi.org/10.1046/j.1365-2184.2001.00222.x>
- Kalechman Y., Herman S., Gafter U., Sredni B. Enhancing effects of autologous erythrocytes on human or mouse cytokine secretion and IL-2R expression. *Cell. Immunol.* 1993;148(1):114–29. DOI: <https://doi.org/10.1006/cimm.1993.1095>
- Ерохин П.С., Осина Н.А., Уткин Д.В. и др. Параметрическая оценка состояния бактериальных клеток, исследованных методом атомно-силовой микроскопии. *Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова*. 2020;16(2):66–71. Erokhin P.S., Osina N.A., Utkin D.V., et al. Parametric assessment of bacterial cells studied using atomic force microscopy. *Yu.A. Ovchinnikov Bulletin of Biotechnology and Physical and Chemical Biology*. 2020;16(2):66–71. EDN: <https://elibrary.ru/vwstesz>
- Yu Y., Yoshimura S.H. Investigating the morphological dynamics of the plasma membrane by high-speed atomic force microscopy. *J. Cell Sci.* 2021;134(17):jcs243584. DOI: <https://doi.org/10.1242/jcs.243584>
- Шерстюкова Е.А., Иноземцев В.А., Козлов А.П. и др. Атомно-силовая микроскопия в оценке механических свойств мембран эритроцитов при воздействии различных физико-химических агентов. *Альманах клинической медицины*. 2021;49(6):427–34. Sherstyukova E.A., Inozemtsev V.A., Kozlov A.P., et al. Atomic force microscopy in the assessment of erythrocyte membrane mechanical properties with exposure to various physicochemical agents. *Almanac of Clinical Medicine*. 2021;49(6):427–34. DOI: <https://doi.org/10.18786/2072-0505-2021-49-059> EDN: <https://elibrary.ru/hvrlrj>
- Анисимова Т.И., Саяпина Л.В., Ледванов М.Ю. и др. Усовершенствование требований к неклиническим испытаниям штаммов чумного микроба, перспективных в качестве вакцинных. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2003;3(3):9–12. Anisimova T.I., Sayapina L.V., Ledvanov M.Yu., et al. Improving the requirements for non-clinical testing of plague microbe strains that are promising as vaccines. *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2003;3(3):9–12.
- Любин Н.А., Конова Л.Б. Методические рекомендации к определению и выведению гемограммы у сельскохозяйственных и лабораторных животных при патологиях. Ульяновск; 2005. Lyubin N.A., Konova L.B. Guidelines for the determination and derivation of hemograms in agricultural and laboratory animals with pathologies. Ulyanovsk; 2005. EDN: <https://elibrary.ru/ysfszt>
- Мороз В.В., Мягкова Е.А., Сергунова В.А. и др. Морфологические особенности эритроцитов у больных с тяжелой сочетанной травмой. *Общая реаниматология*. 2013;9(3):14–23. Moroz V.V., Myagkova E.A., Sergunova V.A., et al. Morphological features of red blood cells in patients with severe concomitant injury. *General Reanimatology*. 2013;9(3):14–23. DOI: <https://doi.org/10.15360/1813-9779-2013-3-14> EDN: <https://elibrary.ru/lhegxn>
- Самойлова Л.В., Пионтковский С.А., Плотникова Е.А. и др. Особенности размножаемости вирулентного и вакцинного штаммов чумного микроба в организме морских свинок. В кн.: Горькова А.В., ред. *Профилактика особо опасных*

- инфекций. Саратов;1988:3–13. Samoilova L.V., Piontkovsky S.A., Plotnikova E.A., et al. Peculiarities of multiplication of virulent and vaccine strains of the plague microbe in the body of guinea pigs. In: Gor'kova A.V., ed. *Prevention of Especially Dangerous Infections*. Saratov;1988:3–13.
17. Кравцов А.Л., Шведун Г.П., Ледванов М.Ю. О действии продуктов плазмид *Y. pestis* на лейкоциты крови морских свинок в процессе иммуногенеза при чуме по данным цитофлуориметрического анализа. *Проблемы особо опасных инфекций*. 1993;(3):135–46. Kravtsov A.L., Shvedun G.P., Ledvanov M.Yu. On the effect of *Y. pestis* plasmid products on the blood leukocytes of guinea pigs during the process of immunogenesis during plague according to cytofluorimetric analysis. *Problems of Particularly Dangerous Infections*. 1993;(3):135–46.
18. Bykowska K., Duk M., Kusnierz-Alejska G., et al. Degradation of human erythrocyte surface components by human neutrophil elastase and cathepsin G: preferential digestion of glycoporphins. *Br. J. Haematol.* 1993;84(4):736–42. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.1993.tb03154.x>
19. Wong K.H.K., Sandlin R.D., Carey T.R., et al. The role of physical stabilization in whole blood preservation. *Sci. Rep.* 2016;6:21023. DOI: <https://doi.org/10.1038/srep21023>
20. Соколова Е.П., Зюзина В.П., Демидова Г.В. и др. Роль резидентных плазмид pMT1, pCD1 и pPCP1 *Yersinia pestis* в образовании экстрацеллюлярной формы липополисахарида. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2017;(3):85–9. Sokolova E.P., Zyuzina V.P., Demidova G.V., et al. The role of *Yersinia pestis* resident plasmids pMT1, pCD1, and pPCP1 in the production of lipopolysaccharide extracellular form. *Problems of Particularly Dangerous Infections*. 2017;(3):85–9. DOI: <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2017-3-85-89> EDN: <https://elibrary.ru/zhgwbx>
21. Pha K., Navarro L. *Yersinia* type III effectors perturb host innate immune responses. *World J. Biol. Chem.* 2016;7(1):1–13. DOI: <https://doi.org/10.4331/wjbc.v7.i1.1>
22. Красильникова Е.А., Трунякова А.С., Вагайская А.С. и др. Подбор новых молекулярных мишеней для оптимизации вакцинопрофилактики и терапии чумы. *Инфекция и иммунитет*. 2021;11(2):265–82. Krasil'nikova E.A., Trunyakova A.S., Vagaiskaya A.S., et al. A search for new molecular targets for optimizing plague preventive vaccination and therapy. *Russian Journal of Infection and Immunity*. 2021;11(2):265–82. DOI: <https://doi.org/10.15789/2220-7619-SNM-1254> EDN: <https://elibrary.ru/dvevgt>
23. Mikaty G., Coullon H., Fiette L., et al. The invasive pathogen *Yersinia pestis* disrupts host blood vasculature to spread and provoke hemorrhages. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2021; 15(10):e0009832. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0009832>
24. Федорова В.А., Девдариани З.Л. Механизм взаимодействия *Yersinia pestis* с эритроцитами и его значение для патогенеза чумы. *Вестник Российской академии медицинских наук*. 2007;(1):13–8. Fyodorova V.A., Devdanani Z.L. The mechanism of interaction between *Yersinia pestis* and erythrocytes, and its importance for the pathogenesis of plague. *Bulletin of the Russian Academy of Medical Sciences*. 2007;(1):13–8 EDN: <https://elibrary.ru/hylolr>
25. Пименов Е.В., Оборин В.А., Ивонин А.Г. Исследование механизмов взаимодействия бактерий вакцинного штамма *Yersinia pestis* EV НИИЭГ с эритроцитами человека. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2012;(4):54–7. Pimenov E.V., Oborin V.A., Ivonin A.G. Investigation of mechanisms of interaction of *Yersinia pestis* EV НИИЭГ vaccine strain bacteria with human red blood cells. *Problems of Particularly Dangerous Infections*. 2012;(4):54–7. DOI: <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2012-4-54-57> EDN: <https://elibrary.ru/pmdkuj>
26. Дубровина В.И., Мухтургин Г.Б., Балахонов С.В. и др. Изучение иммунофизиологических свойств штаммов чумного микроба с различным плазмидным составом. *Бюллетень Восточно-Сибирского научного центра Сибирского отделения Российской академии медицинских наук*. 2013;(6):136–9. Dubrovina V.I., Mukhturgin G.B., Balakhonov S.V., et al. Studying of immunophysiological properties of *Yersinia pestis* strains with various plasmid composition. *Bulletin of the East Siberian Scientific Center SB RAMS*. 2013;(6):136–9. EDN: <https://elibrary.ru/rwbmox>
27. Нагорнов Ю.С. Метод определения внутриклеточного давления эритроцитов по данным атомно-силовой микроскопии. Часть 2. Экспериментальные исследования. *Наука. Мысль: электронный периодический журнал*. 2016;6(6-2):23–4. Nagornov Yu.S. Method for determining the intracellular pressure of erythrocytes according to atomic force microscopy. Part 2. Experimental studies. *A science. Thought: Electronic Periodical Journal*. 2016;6(6-2):23–34. EDN: <https://elibrary.ru/wadntr>
28. Лобов И.А., Давлеткильдеев Н.А. Влияние способа подготовки образца на морфофункциональные характеристики эритроцитов при исследовании методом атомно-силовой микроскопии. *Вестник Омского университета*. 2013;(2):129–32. Lobov I.A., Davletkildeev N.A. Effect of sample preparation technique on morphofunctional parameters of erythrocytes is studied by atomic force microscopy. *Herald of Omsk University*. 2013;(2):129–32. EDN: <https://elibrary.ru/pxrlpm>
29. Ващенко В.И., Вильянинов В.Н., Скрипай Л.А., Сороколетова Е.Ф. Везикуляция эритроцитов человека и её роль в донорских эритроцитсодержащих компонентах. *Вестник Российской военно-медицинской академии*. 2020;(1):173–9. Vashchenko V.I., Vil'yaninov V.N., Skripai L.A., Sorokoletova E.F. Vesiculation red blood cells. Its role in donor erythrocytes components. *Bulletin of the Russian Military Medical Academy*. 2020;(1):173–9. EDN: <https://elibrary.ru/rftpsc>
30. Мороз В.В., Кирсанова А.К., Новодержкина И.С. и др. Изменения ультраструктуры поверхности мембран эритроцитов после кровопотери и их коррекция лазерным облучением. *Общая реаниматология*. 2010;6(2):5–9. Moroz V.V., Kirsanova A.K., Novoderzhkina I.S., et al. Changes in the surface of red blood cell membranes after blood loss and their correction with laser irradiation. *General Reanimatology*. 2010;6(2):5–9. DOI: <https://doi.org/10.15360/1813-9779-2010-2-5>
31. Белова Л.А., Машин В.В., Прошин А.Н., Костишко Б.Б. Воздействие вазонита на структурно-функциональное состояние цитоплазматической мембраны эритроцитов больных с ишемическим инсультом. *Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова*. 2015;115(3):83–5. Belova L.A., Mashin V.V., Proshin A.N., Kostishko B.B. The effect of vasonit on the structural/functional state of erythrocyte cytoplasmic membrane in patients with ischemic stroke. *S.S. Korsakov Journal of Neurology and Psychiatry*. 2015;115(3):83–5. DOI: <https://doi.org/10.17116/jnevro20151153183-85> EDN: <https://elibrary.ru/tvujpz>

Информация об авторах

Клюева Светлана Николаевна  — к.б.н., н.с. отдела иммунологии Российского противочумного института «Микроб», Саратов, Россия, klyueva.cvetlana@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-5550-6063>

Бугоркова Светлана Александровна — д.м.н., г.н.с. отдела иммунологии Российского противочумного института «Микроб», Саратов, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-7548-4845>

Ерохин Павел Сергеевич — к.б.н., н.с. отдела микробиологии Российского противочумного института «Микроб», Саратов, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-2175-5333>

Гончарова Анастасия Юрьевна — к.м.н., н.с. отдела иммунологии Российского противочумного института «Микроб», Саратов, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-9994-7936>

Кравцов Александр Леонидович — д.б.н., в.н.с. отдела иммунологии Российского противочумного института «Микроб», Саратов, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-9016-6578>

Участие авторов: *Клюева С.Н.* — проведение исследований, сбор и обработка материала, статистическая обработка, написание статьи; *Бугоркова С.А.* — концепция и дизайн исследования, редактирование; *Ерохин П.С.* — проведение исследований методом атомно-силовой микроскопии, редактирование; *Гончарова А.Ю.* — проведение исследований; *Кравцов А.Л.* — концепция исследования, редактирование. Все авторы внесли существенный вклад в проведение поисково-аналитической работы и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию до публикации.

Статья поступила в редакцию 01.02.2024;
принята к публикации 03.04.2024;
опубликована 29.06.2024

Information about the authors

Svetlana N. Klyueva  — Cand. Sci. (Biol.), researcher, Russian Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov, Russia, klyueva.cvetlana@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-5550-6063>

Svetlana A. Bugorkova — D. Sci. (Med.), chief researcher, Immunology department Russian Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-7548-4845>

Pavel S. Erokhin — Cand. Sci. (Biol.), researcher, Immunology department Russian Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-2175-5333>

Anastasiya Yu. Goncharova — Cand. Sci. (Med.), researcher, Immunology department Russian Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-9994-7936>

Aleksandr L. Kravtsov — D. Sci. (Biol.), leading researcher, Immunology department Russian Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-9016-6578>

Author contribution: *Klyueva S.N.* — conducting research, collecting and processing material, statistical processing, writing the article; *Bugorkova S.A.* — study concept and design, editing; *Erokhin P.S.* — conducting research using atomic force microscopy, editing; *Goncharova A.Yu.* — conducting research; *Kravtsov A.L.* — study concept, editing. All authors confirm that they meet the International Committee of Medical Journal Editors criteria for authorship, made a substantial contribution to the conception of the article, acquisition, analysis, interpretation of data for the article, drafting and revising the article, final approval of the version to be published.

The article was submitted 01.02.2024;
accepted for publication 03.04.2024;
published 29.06.2024