

Оригинальное исследование
<https://doi.org/10.36233/0372-9311-627>



Перспектива применения биофлуоресцентных белков на этапе доклинической оценки живых вакцин на примере вакцинного штамма *Yersinia pestis* EV НИИЭГ рTURBOGFP-B

Клюева С.Н.[✉], Буданова А.А., Кравцов А.Л., Бугоркова С.А.

Российский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора, Саратов, Россия

Аннотация

Введение. Актуальны исследования, направленные на поиск наиболее информативного и оптимизированного метода оценки приживаемости вакцинного штамма чумного микроба в организме животных, привитых против чумы.

Цель работы — оценить целесообразность использования биофлуоресцентных белков на примере вакцинного штамма *Yersinia pestis* EV НИИЭГ рTurboGFP-B (EVGFP) в схемах сочетанного применения с иммуномодуляторами на этапе доклинической оценки живых вакцин.

Материалы и методы. Морских свинок иммунизировали EVGFP, выращенным при 28°C и 37°C (EVGFP28 и EVGFP37 соответственно), в сочетании с иммуномодуляторами: азоксимера бромидом (АБ) и интерфероном-γ человеческого рекомбинантным (ИЧР).

Результаты. Методом люминесцентной микроскопии выявлено обсеменение (до 600 м.к. в одном поле зрения) клетками EVGFP места введения культуры во всех опытных группах на 1-е сутки. Методом проточной цитометрии *in vivo* установлено, что на 1-е сутки во всех опытных группах фагоцитарный индекс (ФИ) составлял в среднем 94,5% с последующим снижением к 4-м суткам в среднем в 4,4 раза (на 21,2%). На 4-е сутки исследования в группе EVGFP37+АБ ФИ превосходил в 1,8 раза аналогичный показатель в группе EVGFP37. Напротив, в группе EVGFP28+ИЧР ФИ снижался в 2,2 раза относительно аналогичного показателя в группе EVGFP28. Кроме того, в группах EVGFP37+АБ и EVGFP37+ИЧР на 4-е сутки ФИ в 2 раза превышали показатели в группах EVGFP28+АБ и EVGFP28+ИЧР соответственно. В группе EVGFP37 фагоцитарное число превосходило в среднем в 1,5 раза показатель в группе EVGFP28.

Заключение. Получены данные, подтверждающие зависимость исхода взаимодействия *in vivo* чумного микроба с фагоцитами селезенки от температуры выращивания бактерий, а также от присутствия АБ и ИЧР. Применение биофлуоресцентных белков, как показано на примере штамма EVGFP и метода проточной цитометрии, расширяет возможности оценки живых вакцин против чумы на доклиническом этапе.

Ключевые слова: биофлуоресцентный вакцинный штамм *Y. pestis* EV НИИЭГ рTurboGFP-B, азоксимера бромид, интерферон-γ человеческий рекомбинантный, фагоцитоз, макрофаги, нейтрофилы, люминесцентная микроскопия, проточная цитофлуориметрия

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» (протокол № 5 от 25.05.2023).

Источник финансирования. Исследование выполнено при поддержке бюджетного финансирования в рамках темы НИР № 123122100020-4.

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

Для цитирования: Клюева С.Н., Буданова А.А., Кравцов А.Л., Бугоркова С.А. Перспектива применения биофлуоресцентных белков на этапе доклинической оценки живых вакцин на примере вакцинного штамма *Yersinia pestis* EV НИИЭГ рTURBOGFP-B. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2025;102(2): 190–200.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-627>

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

Possibilities and prospects of using biofluorescent proteins at the stage of preclinical evaluation of live vaccines, using the example of the *Yersinia pestis* vaccine strain EV NIEG pTURBOGFP-B

Svetlana N. Klyueva[✉], Angelina A. Budanova, Aleksandr L. Kravtsov, Svetlana A. Bugorkova

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

Abstract

Introduction. Currently, studies aimed at finding the most informative and optimized method for assessing the survival rate of the plague microbe vaccine strain in the body of animals vaccinated against plague are relevant.

Aim — to evaluate the feasibility of using biofluorescent proteins using the example of the *Yersinia pestis* vaccine strain EV NIEG pTurboGFP-B (EVGFP) in combination regimens with immunomodulators at the stage of preclinical evaluation of live vaccines.

Materials and methods. Guinea pigs were immunized with EVGFP grown at 28°C and 37°C (EVGFP28 and EVGFP37, respectively), in combination with immunomodulators (azoximer bromide, AB, and human recombinant interferon gamma, HRI).

Results. Fluorescence microscopy revealed seeding (up to 600 m.c. in one field of view) with EVGFP cells at the site of culture introduction in all experimental groups on the 1st day. *In vivo* flow cytometry showed that on the 1st day in all experimental groups the phagocytic index (PI) averaged 94.5%, with a subsequent decrease by the 4th day by an average of 4.4 times (21.2%). On the 4th day of the study in the EVGFP37+AB group the PI exceeded the similar indicator in the EVGFP37 group by 1.8 times. On the contrary, in the EVGFP28+HRI group the PI decreased by 2.2 times relative to the similar indicator in the EVGFP28 group. In addition, in the EVGFP37+AB and EVGFP37+HRI groups, on day 4, the PI was 2 times higher than in the EVGFP28+AB and EVGFP28+HRI groups, respectively. In the EVGFP37 group, the phagocytic number was on average 1.5 times higher than in the EVGFP28 group.

Conclusion. The obtained data confirm the dependence of the outcome of *in vivo* interaction of the plague microbe with spleen phagocytes on the temperature of bacterial growth, as well as on the presence of AB and HRI. The use of biofluorescent proteins, as shown by the example of the EVGFP strain and the flow cytometry method, expands the possibilities for assessing live plague vaccines in preclinical studies.

Keywords: biofluorescent *Y. pestis* vaccine strain EV NIEG pTurboGFP-B, azoximer bromide, human recombinant interferon gamma, phagocytosis, macrophages, neutrophils, fluorescence microscopy, flow cytometry

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 Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe" (protocol No. 5 of May 25, 2023).

Funding source. The study was supported by budget funding within the framework of the research topic No 123122100020-4.

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., Budanova A.A., Kravtsov A.L., Bugorkova S.A. Possibilities and prospects of using biofluorescent proteins at the stage of preclinical evaluation of live vaccines, using the example of the *Yersinia pestis* vaccine strain EV NIEG pTURBOGFP-B. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology*. 2025;102(2): 190–200.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-627>

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

Введение

В последние годы в биологических и медицинских исследованиях в качестве легко детектируемых маркеров микроорганизмов применяют различные флуоресцентные белки. Одним из таких белков является зелёный флуоресцентный белок GFP (green fluorescent protein), обнаруженный у медузы *Aequorea victoria* [1, 2]. Преимущества ис-

пользования белка GFP по сравнению с другими репортерными белками заключаются в его способности флуоресцировать в отсутствие какого-либо кофактора или субстрата, продолжительном сигнале, низкой метаболической токсичности, отсутствии фоновой флуоресценции. На сегодняшний день доступен и успешно используется широкий спектр различных плазмид, сконструированных на основе

GFP. Например, коммерческий вектор pTurboGFP-B обеспечивает стабильную экспрессию и быстрое созревание флуоресцентного белка [2].

Сконструированные штаммы *Yersinia pestis*, продуцирующие GFP, используют при исследовании условий формирования симбиозов с простейшими и/или моделировании взаимодействия с клетками хозяина (млекопитающие — грызуны) [3, 4], с переносчиком (блохи) [5]. Флуоресцентный белок GFP в качестве биосенсора успешно применяется для обнаружения *Y. pestis* в смешанных культурах, отслеживания бактерий *in vitro* и *in vivo*, установления внутриклеточной локализации клеток рекомбинантных штаммов *Y. pestis*, оценки фагоцитоза *Y. pestis* макрофагами мышей BALB/c [6–9]. Геномные технологии позволили использовать GFP в качестве молекулярного вектора для разработки вакцин против различных бактериальных и вирусных инфекций человека и животных [1, 10].

Одной из основных задач доклинических исследований при разработке живых вакцин против чумы является определение степени остаточной вирулентности (безвредности) вакцинного штамма чумного микроба по приживаемости и распространяемости в макроорганизме. Традиционно учёт приживаемости живых клеток штаммов чумного микроба проводят бактериологическим методом. Маркирование штаммов *Y. pestis* флуоресцентными белками открывает новые возможности, позволяющие проводить мониторинг микроорганизмов в условиях *in vivo* с помощью ряда других методик, к которым относятся люминесцентная микроскопия, обеспечивающая визуализацию возбудителя чумы по наличию специфического флуоресцентного свечения [3, 4], и проточная цитометрия, способствующая определению количества живых микробных клеток по параметрам светорассеяния и интенсивности флуоресценции каждой индивидуальной клетки в суспензии органов [11].

Известно, что эталонный вакцинный штамм *Y. pestis* EV НИИЭГ приживается и размножается в органах лабораторных животных, что способствует развитию активного противочумного иммунитета [12]. Одним из наиболее значимых факторов, влияющих на приживаемость возбудителя чумы, способного размножаться в различных условиях, сходных со средой его обитания в теле теплокровных млекопитающих (37°C) и пойкилотермных блох (20–28°C), является температурный [13]. Температурозависимая адаптационная стратегия *Y. pestis* — существенная часть концепции преодоления бактерией механизмов врождённой иммунологической защиты, таких как фагоцитоз и индукция воспалительного ответа макрофагами и нейтрофилами [13].

Использование различных иммуномодуляторов в схеме противочумной вакцинации позволяет уменьшать антигенную нагрузку на организм,

не снижая напряжённости иммунного ответа. Так, азоксимера бромид (АБ) в сочетании с вакцинным штаммом *Y. pestis* EV НИИЭГ оказывает стимулирующее воздействие на реактивность клеток фагоцитарной системы лабораторных животных, повышает протективную активность живой противочумной вакцины почти в 3 раза и так же, как и интерферон-γ человеческий рекомбинантный (ИЧР), стимулирует антителообразование и цитокиновый ответ [14–16].

С учётом всех вышеперечисленных факторов сделана попытка расширения возможности оценки эффективности и длительности нестерильной фазы иммунного ответа, являющейся обязательным этапом формирования специфического противочумного иммунитета, за счёт использования люминесцентных белков при тестировании различных схем применения живой чумной вакцины.

Цель работы — оценить целесообразность использования биофлуоресцентных белков на примере вакцинного штамма *Y. pestis* EV НИИЭГ pTurboGFP-B в схемах сочетанного его применения с иммуномодуляторами на этапе доклинической оценки живых вакцин.

Материалы и методы

Для создания штамма, продуцирующего GFP, был использован вакцинный штамм *Y. pestis* EV НИИЭГ. Ген, кодирующий синтез TurboGFP, был введён в составе коммерческой векторной плазмиды pTurboGFP-B (4103 п. н., «Evrogen») методом электропорации согласно рекомендациям [17]. Электропорацию выполняли на приборе «Gene Pulser Xcell» («Bio-Rad») с применением стандартного протокола для прокариотических клеток. Наличие коммерческой плазмиды устанавливали по маркеру антибиотикорезистентности, высеивая штамм на пластинки агар LB с 50 мкг/мл ампициллина. Колонии просматривали невооружённым глазом, а также на люминесцентном микроскопе «Axio Lab.A1» («Carl Zeiss Microscopy GmbH»), регистрируя интенсивное флуоресцентное свечение в ультрафиолетовой области спектра. Сконструированный рекомбинантный штамм получил обозначение *Y. pestis* EV НИИЭГ pTurboGFP-B (EVGFP) и был депонирован под номером КМ 2115 в Государственной коллекции патогенных бактерий Российского противочумного института «Микроб» Роспотребнадзора.

Штамм *Y. pestis* EV НИИЭГ выращивали на агаре LB (pH 7,2), а биофлуоресцентный штамм EVGFP — на агаре LB (pH 7,2) с ампициллином (50 мг/мл) в течение 48 ч при 28°C. Кроме того, использовали культуру клеток EVGFP, обладающую повышенной устойчивостью к лейкоцитарному фагоцитозу [18]. Для этого клетки EVGFP высевали из 2-суточной 28°C культуры в конечной концентрации 1×10^7 КОЕ/мл на бульон LB (pH 7,2) и культивировали в условиях аэрации при 37°C в течение

18 ч. Из культур EVGFP, выращенных при 28°C («EVGFP28») и 37°C («EVGFP37») по стандарту мутности ОСО 42-28-59-85П, готовили взвеси концентрации 4×10^9 КОЕ/мл.

Экспериментальной моделью служили морские свинки массой 250–350 г, полученные из отдела экспериментальных животных с виварием Российского противочумного института «Микроб» Роспотребнадзора. Животные были распределены на 6 опытных групп по 12 особей в каждой. Морских свинок подкожно иммунизировали штаммом EVGFP, выращенным при 28°C (1–3-я группы) и 37°C (4–6-я группы), в дозе 2×10^9 КОЕ/0,5 мл. Морским свинкам из 2-й и 5-й групп дополнительно за 1 ч до иммунизации подкожно вводили АБ («ПетроваксФарм») в концентрации 60 мкг (EVGFP28+АБ и «EVGFP37+АБ» соответственно). Биомодели 3-й и 6-й групп дополнительно получали ИЧР («Фармаклон») в концентрации 2000 МЕ (EVGFP28+ИЧР и EVGFP37+ИЧР соответственно). Контрольную, 7-ю группу составили интактные морские свинки (4 особи). Все манипуляции с животными проводили в соответствии с законодательством Российской Федерации¹ и международными принципами². Эксперименты по иммунизации животных выполняли в соответствии с СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней»³. Программа экспериментальной работы с животными была одобрена Комиссией по биоэтике при Российском научно-исследовательском противочумном институте «Микроб» Роспотребнадзора (протокол № 5 от 25.05.2023).

Биохимические свойства *Y. pestis* изучали с помощью стандартных биохимических тест-стрипов API («bioMérieux SA»).

Морфологию бактериальных клеток оценивали с помощью светового микроскопа «Olympus CX41» («Olympus») и цифровой камеры VZ-C31S («VideoZavr») в программе «VideoZavr v. 1.5» при увеличении $\times 40$ и 100 .

Приживаемость штамма EVGFP в органах морских свинок оценивали микроскопическим и проточно-цитометрическим методами. На 1, 4, 7 и 14-е сутки иммуногенеза животных умерщвляли хлороформом, вскрывали и делали мазки-отпечатки внутренних органов (место введения, паховые лимфатические узлы, кровь, селезёнка, печень, лёгкие). Мазки-отпечатки органов животных просматривали в люминесцентном микроскопе «Axio LAB. A1» («Carl Zeiss») с объективом A-Plan 100x/1,25

OiI при увеличении $\times 1000$. Исследовали под микроскопом и фотографировали по 5 полей зрения на препарат. Фотографии получали с помощью камеры «AxioCam ERc5s» («Carl Zeiss»).

Для исследования приживаемости *Y. pestis* EVGFP с помощью проточной цитометрии общепринятым методом готовили взвесь клеток селезёнки в концентрации 10^6 клеток/мл в среде RPMI-1640 с гентамицином (100 мкг/мл). Затем к 100 мкл полученной взвеси добавляли 1 мл разведённого в 10 раз (согласно инструкции) «BD FACS Lysing Solution» («BD Biosciences») для лизиса эритроцитов и фиксации лейкоцитов и выдерживали образцы в течение 20 мин.

Клеточные суспензии анализировали на проточном цитофлуориметре «CyAn ADP» в программе «Summit v.4.3 Built 2445». Детекцию бактерий EVGFP в фагоцитах (макрофаги и нейтрофилы) селезёнки морских свинок проводили по ранее разработанному протоколу определения показателей фагоцитарной реакции в крови человека и животных с ФИТЦ-мечеными клетками *Y. pestis* EV НИИЭГ [15, 19]. Во взвесах клеток селезёнки фагоциты дифференцировали по параметрам светорассеяния (размеру и степени гранулярности) от лимфоцитов, а затем путём гейтирования фагоцитарной популяции определяли в селезёнке процент флуоресцирующих фагоцитов (макрофаги, нейтрофилы), что соответствовало относительному содержанию активных фагоцитов (ФИ — фагоцитарный индекс, %), поглотивших *in vivo* живые клетки исследуемого биофлуоресцентного штамма чумного микроба. Среднее количество поглощённых фагоцитами бактерий (ФЧ — фагоцитарное число) оценивали по среднему значению интенсивности их свечения в зелёной области спектра (Mean), измеряемому в условных единицах интенсивности флуоресценции (каналах цитофлуориметра) [14, 19–21].

Статистическую обработку полученных результатов проводили с использованием стандартного пакета программ «Microsoft Office Excel 2016», «Statistica 10.0» («StatSoft Inc.»). Данные представляли в виде медианы (Me) и квартилей [Q_{25} ; Q_{75}] с расчётом достоверности различий в исследуемых группах с использованием U-критерия Манна–Уитни.

Результаты

Сравнительный анализ культур исходного вакцинного штамма и вакцинного штамма с биофлуоресцентной меткой

Проведено сравнение культурально-морфологических и биохимических свойств рекомбинантного EVGFP и исходного *Y. pestis* EV НИИЭГ штаммов. Установлено, что рекомбинантный штамм обладал типичной для возбудителя чумы морфоло-

¹ Приказ Минздрава России № 199Н «Об утверждении Правил надлежащей лабораторной практики», 2016.

² Директива 2010/63/EU Европейского парламента и Совета Европейского союза по охране животных, используемых в научных целях, 2010.

³ Зарегистрировано в Минюсте России 15.02.2021 № 62500.

гией клеток. Клетки штамма EVGFP, несущие ген флуоресцентного белка GFP, выявляли по наличию зелёного флуоресцентного свечения бактерий. На агаре LB с ампициллином штамм EVGFP формировал характерный R-тип колоний жёлто-зелёного цвета (**рис. 1**).

Характерными признаками роста возбудителя чумы в жидкой питательной среде являлись прозрачный бульон и рыхлый, порошковидный или хлопьевидный осадок на дне пробирки, легко распадающийся при встряхивании. На основании проведённого анализа биохимических свойств установлено, что рекомбинантный штамм EVGFP по своим характеристикам не отличался от исходного *Y. pestis* EV НИИЭГ. Оба штамма ферментировали глюкозу, маннит, арабинозу, не разлагали инозит, сорбит, рамнозу, сахарозу, мелибиозу и амигдалин.

Введение морским свинкам штамма EVGFP в массивной дозе 2×10^9 КОЕ не вызывало гибели биомodelей за весь период наблюдения.

Таким образом, исследуемый штамм EVGFP по культурально-морфологическим и биохимическим свойствам не отличался от исходного *Y. pestis* EV НИИЭГ, а также по признаку безвредности соответствовал эталонному вакцинному штамму.

*Оценка приживаемости *Y. pestis* EV НИИЭГ pTurboGFP методом люминесцентной микроскопии*

При микроскопическом исследовании клетки EVGFP были выявлены в мазках-отпечатках только из места введения культуры во всех группах иммунизированных морских свинок и только в 1-е сутки иммунного ответа (**рис. 2**). Клет-

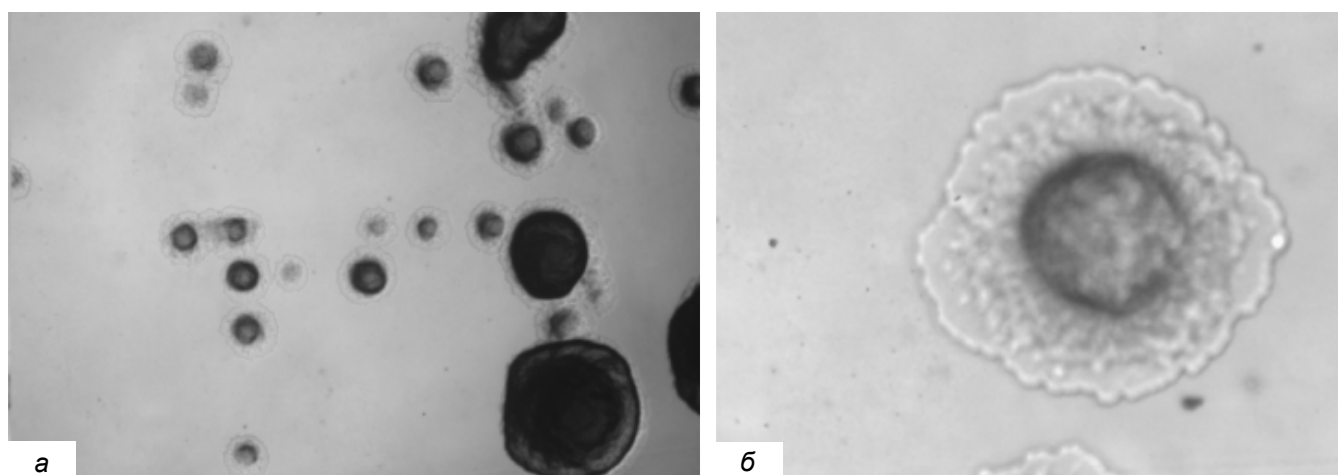


Рис. 1. R-тип колоний *Y. pestis* EV НИИЭГ pTurboGFP-B, $\times 40$ (а) и $\times 100$ (б).

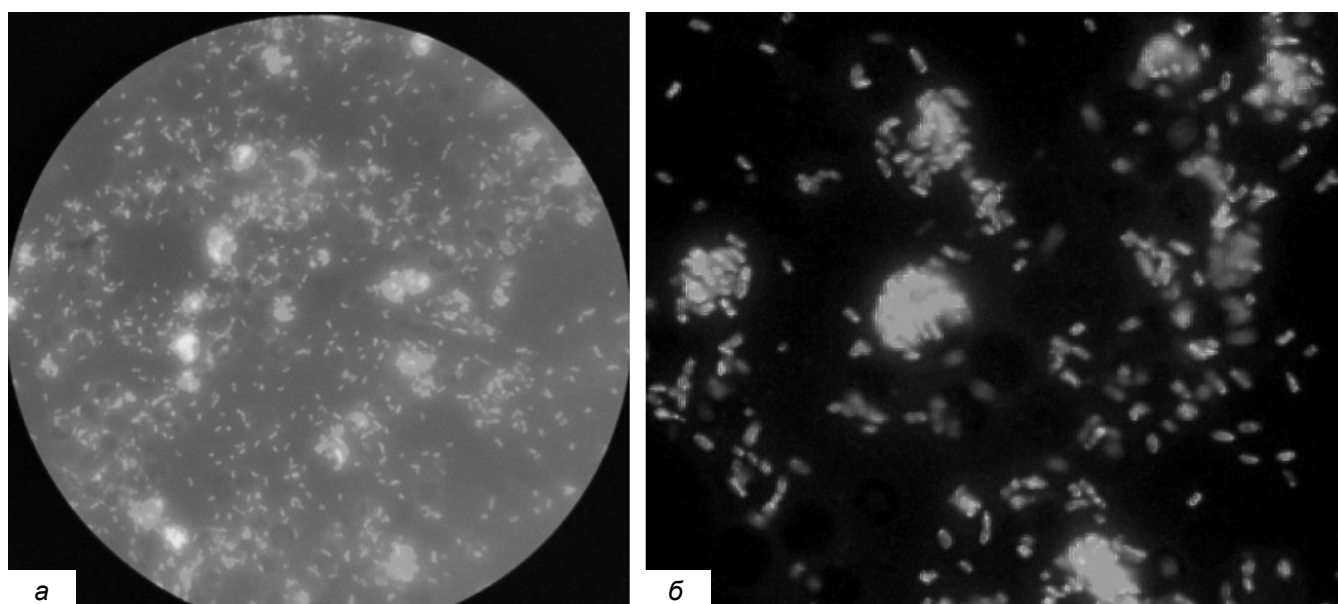


Рис. 2. Детекция клеток биофлуоресцентного вакцинного штамма *Y. pestis* EV НИИЭГ pTurboGFP-B в мазках-отпечатках морской свинки (место введения) на 1-е сутки иммунного ответа при увеличении $\times 1000$.

а — изображение в окуляре микроскопа; б — изображение с монитора компьютера.

ки флуоресцирующего штамма визуализировали в виде ярко-зелёных палочек. Количество бактерий составляло 400 ± 100 м. к. в одном поле зрения, что свидетельствовало об обильном обсеменении клетками EVGFP места введения. При дальнейшем наблюдении на 4, 7 и 14-е сутки иммуногенеза в мазках-отпечатках всех исследуемых органов морских свинок клетки рекомбинантного штамма не регистрировали.

*Оценка приживаемости *Y. pestis* EV НИИЭГ pTurboGFP с использованием проточно-цитофлуориметрической технологии*

Принимая во внимание тот факт, что нейтрофилы и макрофаги селезёнки являются одними из основных объектов для оценки фагоцитоза и приживаемости *Y. pestis* [11], целесообразно было для цитометрических исследований использовать клетки селезёнки морских свинок.

По интенсивности сигнала флуоресценции белка GFP определяли присутствие EVGFP в популяции фагоцитов селезёнки (макрофаги и нейтрофилы), а также учитывали показатели фагоцитарной реакции *in vivo*. Гистограммы на рис. 3, б–д демонстрируют динамику снижения в селезёнке относительного числа фагоцитов, характеризующихся интенсивной зелёной флуоресценцией, обусловленной поглощением клеток штамма EVGFP, выращенного при 37°C.

На рис. 3 наглядно видно, что в интервале от 1-х до 4-х суток доля флуоресцирующих фагоцитов снижалась с 94,54 до 21,23%, а к 14-м суткам — до 0, т. е. до значений, характерных для фагоцитов селезёнки интактных (контрольных) животных, не обладающих флуоресцентным свечением в зелёной области спектра (рис. 3, е).

Сравнительная оценка влияния иммуномодулирующих препаратов при сочетанном применении с биофлуоресцентным штаммом и условий его культивирования на фагоцитарную активность клеток селезёнки

На следующем этапе проводили анализ эффективности применения препаратов на исход взаимодействия исследуемого штамма EVGFP с фагоцитами селезёнки морских свинок в условиях *in vivo*. На 4-е сутки иммуногенеза установлено достоверное снижение ФИ в группе EVGFP28+ИЧР по сравнению с аналогичным показателем в группе EVGFP28 (таблица).

В группе EVGFP37+ИЧР показатель ФИ регистрировали на уровне аналогичного показателя в группе EVGFP37. В те же сроки (4-е сутки) в группе EVGFP37+АБ ФИ достоверно повышался ($p < 0,05$) по сравнению с аналогичным показателем в группе EVGFP37. Выявлено достоверное увеличе-

ние показателя ФЧ в группе EVGFP28+АБ на 4-е и 7-е сутки, а в группе EVGFP28+ИЧР на 7-е сутки в сравнении с данным показателем в группе EVGFP28 ($p < 0,05$).

Далее определяли влияние температуры культивирования EVGFP на способность фагоцитов селезёнки морских свинок поглощать и переваривать клетки флуоресцентного штамма. В группах EVGFP37+АБ и EVGFP37+ИЧР на 4-е сутки показатели ФИ в 2 раза превышали ($p < 0,05$) аналогичные показатели в группах EVGFP28+АБ и EVGFP28+ИЧР соответственно. В группе EVGFP37 на 4-е сутки показатель ФЧ превосходил в среднем в 1,5 раза ($p < 0,05$) аналогичный показатель в группе EVGFP28.

Обсуждение

Доклинический этап оценки живых противочумных вакцин должен не только продемонстрировать, что вакцина является иммуногенной и обладает протективной эффективностью, но также обосновать безопасность препарата, связанную в первую очередь, со степенью остаточной вирулентности (безвредности) вакцинного штамма чумного микроба, характеризующейся его способностью к распространению и длительной персистенции в органах биомоделей.

Приживаемость клеток биофлуоресцентного штамма изучали в органах морских свинок микроскопическим и проточно-цитометрическим методами в течение 14 сут, что соответствует допустимому периоду размножения клеток вакцинного штамма *Y. pestis* EV НИИЭГ, обусловливающему иммунологическую перестройку организма (нестерильная фаза иммунитета) [12].

Метод люминесцентной микроскопии — один из основных оптических методов флуоресцентной визуализации [22] — позволяет наглядно и эффективно оценивать этапность распространения вирулентных штаммов в органах и тканях белых мышей [4]. В наших исследованиях установленная визуализация EVGFP в мазках-отпечатках из места введения культуры во всех опытных группах в 1-е сутки иммунного ответа согласуется с результатами ранее проведённых количественных бактериологических исследований, при которых наибольшее количество клеток вакцинного штамма *Y. pestis* EV НИИЭГ обнаруживали в месте введения ($2,3 \times 10^7$ м.к./г) через 24 ч [12].

Отсутствие флуоресцентных микробных клеток на 4, 7 и 14-е сутки иммуногенеза связано, вероятно, с низкой концентрацией EVGFP в мазках-отпечатках ($< 10^5$ м.к./мл), лежащей за пределами нижнего порога чувствительности люминесцентной микроскопии, составляющего 10^5 м.к./мл [23].

Новые возможности открыло использование более чувствительной и производительной техно-

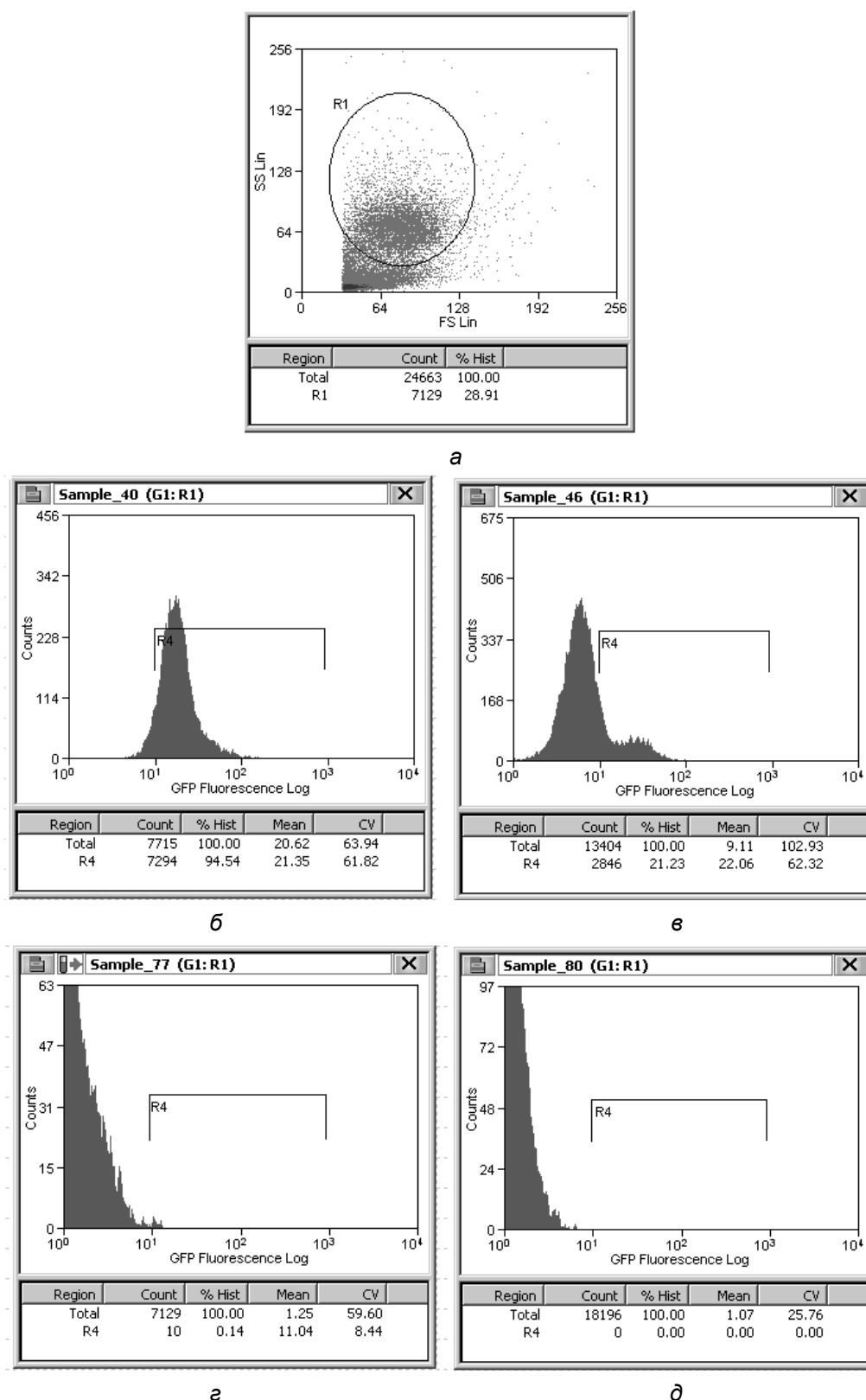


Рис. 3. Интенсивность флуоресценции фагоцитов селезёнки морских свинок, иммунизированных биофлуоресцентным вакцинным штаммом *Y. pestis* EV НИИЭГ рTurboGFP-B (37°C) в динамике иммунного ответа.

а: область R1 соответствует общему количеству фагоцитов FS/SS dot plot образца клеток селезёнки морской свинки, привитой исходным вакцинным штаммом *Y. pestis* EV НИИЭГ (контроль). Представлено характерное распределение отдельных фагоцитов селезёнки по размеру (FS) и по степени гранулярности (SS). Фагоциты селезёнки (28,91% клеток) локализуются в области R1 цитограммы.

Активные фагоциты локализуются на гистограммах в области R4: б–д: 1, 4, 7 и 14-е сутки соответственно после иммунизации морских свинок *Y. pestis* EV НИИЭГ рTurboGFP-B (37°C).

Детекция биофлуоресцентного вакцинного штамма *Y. pestis* EV НИИЭГ pTurboGFP в фагоцитах селезёнки морских свинок при иммунизации в сочетании с иммуномодуляторами по данным проточной цитометрии, Me [Q₂₅; Q₇₅]

Группа	Схема иммунизации	Сутки	Фагоцитарный индекс, %	Фагоцитарное число
1	EVGFP28	1	89,2 [83,0; 95,4]	19,3 [17,0; 21,5]
		4	19,8 [16,6; 22,0]	12,6 [11,8; 13,4]
		7	0,07 [0; 0,1]	1,6 [0,9; 2,3]
		14	0	0,7 [0,5; 0,8]
2	EVGFP28+АБ	1	99,1 [98,0; 99,4]	24,8 [20,7; 28,9]
		4	17,5 [15,4; 19,6]	19,2 [17,5; 20,9]*
		7	0,02 [0; 0,05]	10,0 [8,9; 11,2]*
		14	0	0
3	EVGFP28+ИЧР	1	97,4 [95,5; 99,4]	22,1 [18,0; 26,2]
		4	9,0 [8,4; 9,6]*	18,2 [15,7; 20,8]
		7	0,06 [0; 0,1]	8,7 [7,9; 9,5]*
		14	0	1,5 [1,3; 1,7]
4	EVGFP37	1	92,5 [87,8; 97,2]	19,6 [16,2; 23,0]
		4	21,2 [18,4; 24,0]	20,1 [15,4; 24,8]#
		7	0,1 [0,05; 0,20]	10,0 [8,3; 11,7]
		14	0,1 [0,05; 0,20]	1,0 [0,9; 1,1]
5	EVGFP37+АБ	1	98,5 [96,8; 99,2]	25,2 [20,0; 30,4]
		4	37,1 [37,0; 41,2]**	17,5 [14,4; 20,6]
		7	0,2 [0,1; 0,3]	10,7 [8,1; 13,3]
		14	0	0,3 [0,1; 0,5]
6	EVGFP37+ИЧР	1	90,6 ± 5,2 [85,4; 95,8]	21,6 [17,1; 26,2]
		4	19,4 [17,6; 21,2]#	21,9 [18,0; 25,8]
		7	0,5 [0,2; 0,8]	10,5 [8,4; 12,6]
		14	0,2 [0,1; 0,3]	2,3 [1,9; 2,7]
7	Контроль (EV)		0	0

Примечание. * — значимые различия с группами 1 и 4 на соответствующие сутки ($p < 0,05$); # — значимые различия между группами 1 и 4, 2 и 5, 3 и 6 на соответствующие сутки ($p < 0,05$).

логии проточно-цитофлуориметрического анализа, позволяющей контролировать *in vivo* выживаемость бактерий в фагоцитах, а также отслеживать их распространение в организме хозяина в динамике [11, 24]. Фагоциты, содержащие флуоресцентные бактериальные клетки, регистрировались в течение 4 сут. Снижение числа флуоресцирующих фагоцитов (к 4-м суткам в среднем в 4,4 раза по сравнению с 1-ми сутками) могло быть связано как с внутриклеточным перевариванием поглощённых бактерий, так и со снижением поглотительной способности фагоцитов по отношению к чуждым микробам, находящимся в активной стадии роста *in vivo* при температуре организма хозяина. Внутриклеточную локализацию EVGFP в макрофагах и нейтрофилах селезёнки подтверждали аналогичные результаты, полученные зарубежными учёными методом проточной цитометрии в опытах с другим флуоресцентным штаммом *Y. pestis* (pAGFP), экспрессирующим GFP [11]. Применявшаяся нами процедура пробоподготовки (Lyse/No-wash) без отмывки спленоци-

тов от лизирующего эритроциты и фиксирующего лейкоциты раствора «FACS Lysing Solution» фактически полностью исключала адгезию бактерий на клеточной поверхности, т. к. растворы, используемые для лизиса эритроцитов, удаляют бактерии, адсорбированные на поверхности фиксированных формальдегидом лейкоцитов [19].

Применение биофлуоресцентного штамма и проточной цитофлуориметрической технологии позволило зарегистрировать различный эффект используемых в работе иммуномодулирующих препаратов по влиянию на исход взаимодействия исследуемого штамма EVGFP с фагоцитами селезёнки морских свинок.

Полученные данные по сочетанному применению АБ с вакцинным штаммом, основанные на анализе фагоцитарной активности макрофагов и нейтрофилов селезёнки морских свинок в нашем эксперименте, подтвердили ранее выявленный факт стимулирующего действия АБ на фагоцитарную активность лейкоцитов крови мышей линии BALB/c

по отношению к *Y. pestis* EV НИИЭГ в тестах *in vitro* [15].

Согласно данным литературы об иммунологическом сходстве в паттернах генетической экспрессии IFN-γ и гомологии аминокислотной последовательности между морской свинкой и человеком [25, 26], ИЧР оказывал иное влияние на процесс фагоцитоза, снижая показатель ФИ и повышая показатель ФЧ (количество микробных клеток на один фагоцит) при 28°C. Объяснить это повышение может предположение о способности ИЧР ингибировать внутриклеточное переваривание бактерий в фагоцитах. Однако такому объяснению противоречит известная способность рекомбинантного IFN-γ активировать макрофаги и вызывать гибель внутриклеточных микроорганизмов [27]. Следовательно, этот факт объясняется влиянием ИЧР на свойства вакцинного штамма, приводящие к снижению его приживаемости в макроорганизме.

В опытах с использованием для вакцинации культур биофлуоресцентного штамма, выращенных в разных температурных режимах, подтверждён известный факт о более длительном выживании и переваривании клеток 37°C культуры *Y. pestis* в макрофагах [28, 29], связанный с индукцией экспрессии CafI (F1) и других антифагоцитарных факторов, блокирующих фагоцитоз: белок наружной мембраны Ail, активатор плазминогена Pla, PsaA (pH6 антиген) [11, 30, 31].

Заключение

На примере применения биофлуоресцентного вакцинного штамма *Y. pestis* EVGFP и метода проточной цитометрии показана возможность повышения эффективности оценки приживаемости в макроорганизме штаммов, а использование цитофлуориметрической технологии увеличивает её информативность и объективность, в том числе за счёт скорости выполнения такого анализа, позволяющего выполнять дополнительные исследования, раскрывающие механизмы взаимодействия микро- и макроорганизма.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ | REFERENCES

- Chacón-Díaz C., Zabalza-Baranguá A., San Román B., et al. *Brucella abortus* S19 GFP-tagged vaccine allows the serological identification of vaccinated cattle. *PLoS One*. 2021;16(11):e0260288. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0260288>
- Gensberger E.T., Kostić T. Green fluorescent protein labeling of food pathogens *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis*. *J. Microbiol. Methods*. 2017;132:21–6. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2016.11.008>
- Куклева Л.М., Тучков И.В., Оглодин Е.Г. и др. Получение штамма *Yersinia pestis*, продуцирующего флуоресцентный белок GFP, и перспективы его использования. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2019;(4):61–6. Kukleva L.M., Tuchkov I.V., Oglodin E.G., et al. Construction of *Yersinia pestis* strain producing fluorescent protein GFP and prospects of its usage. *Problems of Particularly Dangerous Infections*. 2019;(4):61–6. DOI: <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2019-4-61-66> EDN: <https://elibrary.ru/kprnki>
- Макашова М.А., Морозов О.А., Оглодин Е.Г. и др. Набор рекомбинантных флуоресцентных штаммов бактерий вида *Yersinia pestis* античного биовара основного подвида и алтайского биовара центральноазиатского подвида для индикации возбудителя чумы в экспериментальных образцах. Патент РФ № 2769790C1;2022. Makashova M.A., Morozov O.A., Oglodin E.G., et al. Set of recombinant fluorescent strains of *Yersinia pestis* bacteria of main subspecies biovar and the Altai biovar of the central Asiatic subspecies for indication of plague agent in experimental samples. Patent RF № 2769790C1; 2022.
- Lemon A., Sagawa J., Gravelle K., Vadyvaloo V. Biovar-related differences apparent in the flea foregut colonization phenotype of distinct *Yersinia pestis* strains do not impact transmission efficiency. *Parasit. Vectors*. 2020;13(1):335. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13071-020-04207-x>
- Bi Y., Du Z., Han Y., et al. *Yersinia pestis* and host macrophages: immunodeficiency of mouse macrophages induced by YscW. *Immunology*. 2009;128(1 Pt. 2):e406–17. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2008.02990.x>
- Bi Y., Wang X., Han Y., et al. *Yersinia pestis* versus *Yersinia pseudotuberculosis*: effects on host macrophages. *Scand. J. Immunol.* 2012;76(6):541–51. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-3083.2012.02767.x>
- Born F., Braun P., Scholz H.C., Grass G. Specific detection of *Yersinia pestis* based on receptor binding proteins of phages pathogens. *Pathogens*. 2020;9(8):611. DOI: <https://doi.org/10.3390/pathogens9080611>
- Su S., Bangar H., Saldanha R., et al. Construction and characterization of stable, constitutively expressed, chromosomal green and red fluorescent transcriptional fusions in the select agents, *Bacillus anthracis*, *Yersinia pestis*, *Burkholderia mallei* and *Burkholderia pseudomallei*. *Microbiologyopen*. 2014;3(5):610–29. DOI: <https://doi.org/10.1002/mbo3.192>
- Shchelkunov S.N., Yakubitskiy S.N., Titova K.A., et al. Enhancing the protective immune response to administration of a LIVP-GFP live attenuated Vaccinia virus to mice. *Pathogens*. 2021;10(3):377. DOI: <https://doi.org/10.3390/pathogens10030377>
- Lukaszewski R.A., Kenny D.J., Taylor R., et al. Pathogenesis of *Yersinia pestis* infection in BALB/c mice: effects on host macrophages and neutrophils. *Infect. Immun.* 2005;73(11):7142–50. DOI: <https://doi.org/10.1128/iai.73.11.7142-7150.2005>
- Самойлова Л.В., Пионтовский 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., Piontkovskii 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.
- Андрюков Б.Г., Сомова Л.М., Тимченко Н.Ф., Исследование температурозависимых молекулярных механизмов развития инфекций — ключ к созданию современных профилактических средств (обзор). *Современные технологии в медицине*. 2016;8(3):137–50. Andryukov B.G., Somova L.A., Timchenko N.F. The study of temperature-dependent molecular mechanisms of infection development as a key to the development of modern prophylactic drugs (review). *Modern Technologies in Medicine*. 2016;8(3):137–50. DOI: <https://doi.org/10.17691/stm2016.8.3.16> EDN: <https://elibrary.ru/xqnhnm>
- Кравцов А.Л., Курылина А.Ф., Клосева С.Н., Щуковская Т.Н. Модулирующий эффект полиоксидония на реактивность клеток иммунной системы при формировании противочум-

- ного иммунитета. *Иммунология*. 2016;37(6):320–5. Kravtsov A.L., Curylina A.F., Klyueva S.N., Shchukovskaya T.N. The modulating effect of polyoxidonium on the reactivity of immune cells in the formation of anti-plague immunity. *Immunology*. 2016;37(6):320–5. DOI: <https://doi.org/10.18821/0206-4952-2016-37-6-320-325> EDN: <https://elibrary.ru/xipgkh>
15. Ключева С.Н., Кравцов А.Л., Бугоркова С.А. и др. Фагоцитарная и цитокин-продуцирующая активность лейкоцитов крови мышей линии BALB/c, привитых против чумы на фоне иммуномодуляции полиоксидонием. *Российский иммунологический журнал*. 2019;13(4):1412–20. Klyueva S.N., Kravtsov A.L., Bugorkova S.N., et al. Blood leukocyte phagocytic and cytokine-producing activity of anti-plague vaccinated BALB/c line mice against the background of immunomodulation by polyoxidonium. *Russian Journal of Immunology*. 2019;13(4):1412–20. EDN: <https://elibrary.ru/aqjuec>
16. Гончарова А.Ю., Бугоркова С.А., Кудрявцева О.М. и др. Экспериментальная оценка эффективности применения вакцинного штамма *Yersinia pestis* EV НИИЭГ в сочетании с иммуномодуляторами. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2020;(2):71–7. Goncharova A.Yu., Bugorkova S.A., Kudryavtseva O.M., et al. Experimental evaluation of application of the vaccine strain *Yersinia pestis* EV NIEG in combination with immune-modulators. *Problems of Particularly Dangerous Infections*. 2020;(2):71–7. DOI: <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2020-2-71-77> EDN: <https://elibrary.ru/fbjedk>
17. Conchas R.F., Carniel E. A highly efficient electroporation system for transformation of *Yersinia*. *Gene*. 1990;87(1):133–7. DOI: [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(90\)90505-1](https://doi.org/10.1016/0378-1119(90)90505-1)
18. Spinner J.L., Winfree S., Starr T., et al. *Yersinia pestis* survival and replication within human neutrophil phagosomes and uptake of infected neutrophils by macrophages. *J. Leukoc. Biol.* 2014;95(3):389–98. DOI: <https://doi.org/10.1189/jlb.1112551>
19. Кравцов А.Л., Ключева С.Н., Кожевников В.А. и др. Влияние противочумной вакцинации на фагоцитарную активность гранулоцитов крови человека. *Российский иммунологический журнал*. 2021;24(1):113–22. Kravtsov A.L., Klyueva S.N., Kozhevnikov V.A., et al. Effect of antiplague vaccination on phagocytic activity of human blood granulocytes. *Russian Journal of Immunology*. 2021;24(1):113–22. DOI: <https://doi.org/10.46235/1028-7221-166-EOA> EDN: <https://elibrary.ru/aibbvs>
20. Олиферук Н.С., Пинегин Б.В. Определение фагоцитарного числа лейкоцитов периферической крови по отношению к *Staphylococcus aureus* с помощью проточной цитометрии. *Иммунология*. 2007;28(4):236–40. Oliferuk N.S., Pinegin B.V. The phagocytic number definition of peripheral blood leukocytes in the ratio *Staphylococcus aureus* with flowing cytofluorimetry. *Immunology*. 2007;28(4):236–40. EDN: <https://elibrary.ru/iatzdj>
21. White-Owen C., Alexander J.W., Sramkoski R.M., Babcock G.F. Rapid whole-blood microassay using flow cytometry for measuring neutrophil phagocytosis. *J. Clin. Microbiol.* 1992;30(8):2071–6. DOI: <https://doi.org/10.1128/jcm.30.8.2071-2076.1992>
22. Ведяйкин А.Д., Ходорковский М.А., Вишняков И.Е. Методы флуоресцентной микроскопии сверхвысокого разрешения и их использование для визуализации различных клеточных структур. *Цитология*. 2019;61(5):343–56. Vedyaykin A.D., Khodorkovskii M.A., Vishnyakov I.E. Super-resolution microscopy methods and their use for visualization of various cell structures. *Cytology*. 2019;61(5):343–56. DOI: <https://doi.org/10.1134/S0041377119050067> EDN: <https://elibrary.ru/unjbeu>
23. Онищенко Г.Г., Кутырев В.В., ред. *Лабораторная диагностика опасных инфекционных болезней. Практическое руководство*. М.;2013. Onishchenko G.G., Kuttyrev V.V., eds. *Laboratory Diagnostics of Dangerous Infectious Diseases. Practical Guide*. Moscow;2013.
24. Tartaro K., VanVolkenburg M., Wilkie D., et al. Development of a fluorescence-based in vivo phagocytosis assay to measure mononuclear phagocyte system function in the rat. *J. Immunotoxicol.* 2015;12(3):239–46. DOI: <https://doi.org/10.3109/1547691x.2014.934976>
25. Yamada H., Udagawa T., Mizuno S., et al. Newly designed primer sets available for evaluating various cytokines and iNOS mRNA expression in guinea pig lung tissues by RT-PCR. *Exp. Anim.* 2005;54(2):163–72. DOI: <https://doi.org/10.1538/expanim.54.163>
26. Jeevan A., Yoshimura T., Lee K.E., McMurray D.N. Differential expression of gamma interferon mRNA induced by attenuated and virulent *Mycobacterium tuberculosis* in guinea pig cells after *Mycobacterium bovis* BCG vaccination. *Infect. Immun.* 2003;71(1):354–64. DOI: <https://doi.org/10.1128/iai.71.1.354-364.2003>
27. Сологуб Т.В., Цветков В.В., Деева Э.Г. Интерферон гамма-цитокин с противовирусной, иммуномодулирующей и противоопухолевой активностью. *Российский медико-биологический вестник имени академика И.П. Павлова*. 2014;22(3):56–60. Sologub T.V., Tsvetkov V.V., Deeva E.G. Interferon gamma-cytokine with antiviral, immunomodulatory and antitumor action. *I. P. Pavlov Russian Medical Biological Herald*. 2014;22(3):56–60. DOI: <https://doi.org/10.17816/pavlovj2014356-60> EDN: <https://elibrary.ru/szvbxl>
28. Du Y., Rosqvist R., Forsberg A. Role of fraction 1 antigen of *Yersinia pestis* in inhibition of phagocytosis. *Infect. Immun.* 2002;70(3):1453–60. DOI: <https://doi.org/10.1128/iai.70.3.1453-1460.2002>
29. Ke Y., Chen Z., Yang R. *Yersinia pestis*: mechanisms of entry into and resistance to the host cell. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2013;3:106. DOI: <https://doi.org/10.3389/fcimb.2013.00106>
30. Подладчикова О.Н. Современные представления о молекулярных механизмах патогенеза чумы. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2017;(3):33–40. Podladchikova O.N. Modern views on molecular mechanisms of plague pathogenesis. *Problems of Particularly Dangerous Infections*. 2017;(3):33–40. DOI: <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2017-3-33-40> EDN: <https://elibrary.ru/zhgvr>
31. Peters D.T., Reifs A., Alonso-Caballero A., et al. Unraveling the molecular determinants of the anti-phagocytic protein cloak of plague bacteria. *PLoS Pathog.* 2022;18(3):e1010447. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1010447>

Информация об авторах

Ключева Светлана Николаевна[✉] — канд. биол. наук, н. с. отдела иммунологии ФКУН Российский противочумный институт «Микроб», Саратов, Россия, klyueva.cvetlana@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-5550-6063>.

Буданова Ангелина Андреевна — канд. биол. наук, с. н. с. отдела иммунологии ФКУН Российский противочумный институт «Микроб», Саратов, Россия, rusrapi@microbe.ru, <https://orcid.org/0000-0002-5092-432X>

Information about the authors

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

Angelina A. Budanova — Cand. Sci. (Biol.), senior researcher, Department of immunology, Russian Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov, Russia, rusrapi@microbe.ru, <https://orcid.org/0000-0002-5092-432X>

Кравцов Александр Леонидович — д-р биол. наук, в. н. с. отдела иммунологии ФКУН Российский противочумный институт «Микроб», Саратов, Россия, kravzov195723@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-9016-6578>.

Бугоркова Светлана Александровна — д-р мед. наук, г. н. с. отдела иммунологии ФКУН Российский противочумный институт «Микроб», Саратов, Россия, rusrapi@microbe.ru, <https://orcid.org/0000-0001-7548-4845>.

Участие авторов: *Клюева С.Н.* — методология и дизайн исследования, проведение экспериментов, микроскопические исследования, статистический анализ, написание рукописи; *Буданова А.А.* — конструирование рекомбинантного биофлуоресцентного штамма, микроскопические исследования; *Кравцов А.Л.* — методология и дизайн исследования, проведение экспериментов, научное редактирование рукописи; *Бугоркова С.А.* — концепция и дизайн исследования, научное редактирование рукописи, руководство. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям Международного комитета редакторов медицинских журналов, внесли существенный вклад в проведение поисково-аналитической работы и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию до публикации.

Статья поступила в редакцию 27.02.2025;
принята к публикации 21.04.2025;
опубликована 28.04.2025

Aleksandr L. Kravtsov — D. Sci. (Biol.), leading researcher, Department of immunology, Russian Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov, Russia, kravzov195723@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-9016-6578>

Svetlana A. Bugorkova — D. Sci. (Med.), chief researcher, Department of immunology, Russian Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov, Russia, rusrapi@microbe.ru, <https://orcid.org/0000-0001-7548-4845>

Author contribution: *Klyueva S.N.* — study methodology and design, experiments, microscopic studies, statistical analysis, manuscript writing; *Budanova A.A.* — construction of recombinant biofluorescent strain, microscopic studies; *Kravtsov A.L.* — study methodology and design, experiments, manuscript editing; *Bugorkova S.A.* — study concept and design, manuscript editing, management. 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 27.02.2025;
accepted for publication 21.04.2025;
published 28.04.2025