

42. Richmond J.Y., Polatnick J., Knudsen R.C. Microassay for interferon, using [3H]uridine, microculture plates, and a multiple automated sample harvester. *Appl. Environ. Microbiol.* 1980, 39(4): 823-827.
43. Rubinstein S., Familletti P.C., Pestka S. Convenient assay for interferons. *J. Virol.* 1981, 37(2):755-758.
44. Sidwell R.W., Huffman J.H. Use of disposable micro tissue culture plates for antiviral and interferon induction studies. *Appl. Microbiol.* 1971; 22(5):797-801.
45. Sui H., Zhou M., Imamichi H. et al. STING is an essential mediator of the Ku70-mediated production of IFN- λ 1 in response to exogenous DNA. *Sci Signal.* 2017; 10(488). Pii: eaah5054. doi: 10.1126/scisignal.aah5054.
46. Tilles J.G., Finland M. Microassay for Human and Chick Cell Interferons. *Applied Microbiology.* 1968; 16 (11):1706-1707.
47. Trinchieri G. Type I interferon: friend or foe? *J. Exp. Med.* (2010) 207:2053—63.10.1084/jem.20101664.
48. Ueno H., Klechevsky E., Morita R. et al. Dendritic cell subsets in health and disease. *Immunol. Rev.* 2007 Oct;219:118-142.
49. Wang S., Sun X., Yi C. et al. Negatively Regulates Type I Interferon Signaling Pathway by Competition Binding IRF3 with CBP/p300. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2017, 7:195. doi: 10.3389/fcimb.2017.00195. eCollection 2017.
50. Yoshizumi T., Imamura H., Taku T. et al. RLR-mediated antiviral innate immunity requires oxidative phosphorylation activity. *Sci. Rep.* 2017, 7(1):5379. doi: 10.1038/s41598-017-05808-w.
51. Zha Z., Bucher F., Nejatfard A., Zheng T. et al. Interferon- γ is a master checkpoint regulator of cytokine-induced differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2017. pii: 201706915. doi: 10.1073/pnas.1706915114.

Поступила 06.08.18

Контактная информация: Оспельникова Татьяна Петровна, к.м.н.,
105064, М.Казенный пер., 5а, р.т. (495)917-49-00

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2019

В.И.Тынянова, Е.П.Соколова, В.П.Зюзина, Г.В.Демидова

ТОКСИГЕННОСТЬ YERSINIA PESTIS

Ростовский-на Дону НИИ противочумный институт

Yersinia pestis относится к числу патогенных бактерий, функцию токсина у которых выполняет структурный компонент клеточной стенки — липополисахарид (ЛПС). Для проявления токсического действия полимер должен быть отделен от внешней мембраны клетки и представлен рецепторам иммунокомпетентных клеток макроорганизма в функционально активной форме. В обзоре проанализирована и обобщена информация отечественных и зарубежных исследователей о токсигенных свойствах *Y. pestis*. Представлены результаты собственных экспериментов, которые свидетельствуют о том, что бактерии чумы способны экспортировать ЛПС в окружающую среду. Процесс является естественной функцией живой клетки, реализуется при температуре 37°C и строго зависит от экспрессии генов внехромосомных элементов наследственности *Y. pestis* — *pMT1*, *pCD1*, *pPCP1*. На примере изогенных вариантов вакцинного штамма *Y. pestis* EV76 и вирулентного штамма *Y. pestis* 231, содержащих различный набор плазмид, установлено, что максимальный вклад в активацию высокотемпературного ЛПС *Y. pestis* и переводу его в экстрацеллюлярную форму вносят белки плазмиды *pCD1*. Значение белка — «мышинного» токсина, кодируемого плазмидой *pMT1*, менее выражено. Участие плазмиды *pPCP1* в проявление токсигенных свойств не обнаружено. Обсуждается роль капсульной субстанции *Y. pestis* и значение

биологически активных факторов макроорганизма в реализации токсического потенциала ЛПС *Y. pestis*. Функциональная взаимосвязь между транслокацией белков, кодируемых плазмидами, и процессом токсигенности *Y. pestis* установлена впервые и отражает биологическую уникальность возбудителя чумы.

Журн. микробиол. 2019, № 3, С. 99—109

Ключевые слова: *Y. pestis*, плазмиды, липополисахарид, токсигенность

V.I.Tyuanova, E.P.Sokolova, V.P.Zyuzina, G.V.Demidova

YERSINIA PESTIS PATHOGENICITY

Rostov-on-Don Research Institute for Plague Control, Russia

Yersinia pestis belongs to those pathogenic bacteria which produce lipopolysaccharide (LPS) having the function of a toxin. In order to make a toxic effect the polymer must be separated from the cell outer membrane and presented to the immunocompetent cell receptors of the host in the functionally active form. In this review data of Russian and foreign investigators on *Y. pestis* toxigenic properties was presented. Results of the authors' own experiments showing that *Y. pestis* is able to export LPS into the surrounding medium are included. This process is a natural function of the living cell, is realized at 37 degrees C and is strictly dependent on the expression of *Y. pestis* genes of extrachromosomal inheritance, pMT1, pCD1, pPCP1. By the use of isogenic variants of *Y. pestis* EV76 vaccine strain and virulent 231 strain containing different plasmid combinations, it was established that maximum contribution in the activation of «high-temperature» LPS and its transformation into extracellular form made the proteins encoded by pCD1. The significance of the «murine» toxin encoded by pMT1 plasmid was less pronounced. The participation of pPCP1 plasmid in the toxic effect was not discovered. The role of *Y. pestis* capsular substance and the significance of biologically active factors in the realization of *Y. pestis* LPS toxic potential is discussed. Functional relationship between translocation of the proteins encoded by plasmids and *Y. pestis* toxigenicity suggests *Y. pestis* biological uniqueness.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2019, No. 3, P. 99—109

Key words: *Y. pestis*, plasmids, lipopolysaccharide, toxicity

Известно, что возбудитель чумы — типичный представитель токсикоинфекций, и развитие заболевания при всех клинических формах сопровождается выраженной и прогрессирующей интоксикацией макроорганизма. Основным патогенетическим фактором *Y. pestis*, выполняющим функцию токсина, является структурный компонент клеточной стенки грамотрицательных бактерий — липополисахарид (ЛПС) [2, 7, 38]. Этот гетерополимер относится к биологически активным веществам опосредованного действия. Для проявления его токсических свойств необходимо отделение ЛПС от внешней мембраны бактерий и представление рецепторам иммунокомпетентных клеток макроорганизма в свободной функционально активной форме. В опытах *in vitro* и *in vivo* показано, что целые клетки *Yersinia pestis* и выделенные из них препараты ЛПС обладают различными иммуномодулирующими свойствами [40, 41]. Максимальное воздействие на рецепторный комплекс TLR4/MD2 оказывает свободная форма ЛПС. В то же время, эффект действия ЛПС, связанного с бактериальной клеткой, незначителен. Объясняется это тем, что токсически активная часть ЛПС (липид А) жестко фиксирована физико-химическими связями с биополимерами внешней мембраны бактерий, что исключает его участие в активации фагоцитарных клеток макроорганизма.

Из данных литературы известно, что ЛПС грамотрицательных бактерий в свободной форме в небольших количествах может высвобождаться в среду при делении клеток, при разрушении бактерий в процессе фагоцитоза, под действием комплекса

белков системы комплемента и при действии антибиотиков, а также обнаруживается в составе бактериальных везикул [29]. Особенность патогенных бактерий, токсический компонент которых представлен ЛПС, состоит в том, что источником функционально активной формы ЛПС являются не разрушенные, как это было принято считать ранее, а живые бактерии, которые способны выделять ЛПС клеточной стенки во внешнюю среду, подобно секреции экзотоксинов белковой природы [48].

Предположение о наличии токсина у *Y. pestis* и высокой токсигенности вирулентных штаммов было высказано впервые А. Иерсином сразу же после открытия им этого микроорганизма (цит. по Домарадскому И.В.) [8]. В дальнейшем изучению природы токсина *Y. pestis* было посвящено большое количество научных работ. Однако факт гипертоксичности *Y. pestis*, который не вызывал сомнения у практикующих врачей, долгое время не мог найти экспериментального подтверждения. Результаты многочисленных опытов по выявлению токсической субстанции *Y. pestis* в средах культивирования бактерий и их фильтратах не имели успеха [8]. Объяснить причину неудач удалось относительно недавно после того, как были получены новые сведения о структурно-функциональной организации ЛПС *Y. pestis*. В начале 2000-х годов практически одновременно были опубликованы работы японского исследователя Kawahara К., затем российских ученых Книрель Ю. и др., которые впервые доказали, что синтез ЛПС у *Y. pestis* регулируется температурой, а изменения химической структуры ЛПС при переходе от низко- к высокотемпературному режиму культивирования бактерий чумы направлены не на усиление токсических свойств ЛПС, а напротив, на снижение его биологической активности [4, 35, 37]. Модификация, которую претерпевает ЛПС 37, приводит практически к полной утрате его токсических свойств: препарат малотоксичен или вообще нетоксичен для биопробных животных и является слабым индуктором провоспалительных цитокинов [1, 18, 23, 42]. Низкая биологическая активность ЛПС 37 могла быть причиной отрицательных результатов опытов по выявлению ЛПС *Y. pestis* в среде инкубации бактерий. Тем не менее три- и тетраацелированные формы липида А, свойственные ЛПС 37, являются обязательным условием для проявления вирулентных свойств *Y. pestis* в условиях *in vivo* [42].

Основополагающей работой, которая определила вектор нового направления исследований, послужили данные, опубликованные А.Н. Кравцовым с соавторами в 1993 г. [14]. Этой группой исследователей был описан феномен повышения вирулентных свойств бактерий чумы в условиях *in vitro* под влиянием биологически активного вещества (БАВ), присутствующего в эритроцитах крови и тканях паренхиматозных органов млекопитающих. При этом отмечены два важных момента: для проявления феномена необходима предварительная инкубация клеток при температуре 37°C, а усиление вирулентных свойств имеет фенотипический характер.

В дальнейшем результаты исследования этого явления были изложены в ряде научных публикаций [18, 20—22]. Выяснено, что биологически активное вещество представляет собой низкомолекулярное соединение с выраженными полярными свойствами и относится к классу гликолипидов. Повышение вирулентности бактерий чумы под его влиянием связано с активацией ЛПС, присутствующего в капсульном веществе *Y. pestis*. Как известно, капсула *Y. pestis* представляет собой сложно организованную надмолекулярную структуру, которую формирует специфический белок CafI (F1) [2, 3, 13]. Биологическая особенность капсулы *Y. pestis* заключается в том, что она не имеет жесткой связи с поверхностными структурами клетки, легко отделяется от них и диффундирует во внешнюю среду. Состав капсульного вещества гетерогенен, и, по данным ряда авторов, содержит ЛПС и специфический белок

Y. pestis избирательной токсичности — «мышинный» токсин (МТ) [10, 12, 18, 24]. Однако, несмотря на присутствие обеих токсических субстанций, внутрибрюшинное введение капсульного вещества биопробным животным даже в очень высоких дозах — 100 — 200 мкг на мышь и 1 — 3 мг на морскую свинку — не приводит к их гибели. Если же на капсульную субстанцию, отделенную от клеток, воздействовать биологически активным веществом, то инокулят становится токсичным для обоих видов животных. Летальным эффектом обладает инокулят, содержащий чрезвычайно малые количества токсических веществ (0,052 мкг МТ и 36 мкг ЛПС для мышей и 0,5 мкг МТ и 360 мкг ЛПС для морских свинок) [18, 20]. Переход от биологически инертного к токсически активному состоянию объясняется изменением физико-химических свойств капсульного вещества под влиянием БАВ [21]. Экспериментально установлено, что БАВ уменьшает плотность упаковки полимеров, увеличивает вязкость капсулы и изменяет молекулярную организацию составляющих ее компонентов. Нарушение слабых взаимодействий меняет пространственную ориентацию биополимеров капсульного вещества, в том числе и ЛПС. По нашим данным, модификация ЛПС под влиянием БАВ заключается в трансформации трехмерной структуры полимеров ЛПС в токсически активную форму. В этих же условиях модулятором токсических свойств ЛПС может быть МТ, который образует комплекс ЛПС-МТ, высокотоксичный как для мышей, так и для морских свинок [17]. В обоих случаях — под влиянием БАВ и МТ — модификация ЛПС заключается в формировании токсически активной конформации полимера без изменения его первичной химической структуры. Таким образом, реализация токсического потенциала ЛПС представляет собой цепь последовательных реакций, в которых принимают участие капсульное вещество бактерий, а также факторы микро- и макроорганизма [22].

В настоящей работе мы акцентировали внимание на изучении первого этапа этого процесса — экспорте ЛПС от внешней мембраны клеточной стенки в капсульное вещество бактерий чумы. Вопрос о том, как и каким образом этот процесс осуществляется, не обсуждался и не имеет научного объяснения. В то же время, присутствие ЛПС в составе капсулы могло быть случайным событием или же результатом активного транспорта ЛПС за пределы бактериальной клетки [13, 25, 28]. Анализ данных литературы об экспортирующих системах микроорганизмов и результаты собственных исследований позволили нам предположить, что процесс образования внеклеточной формы ЛПС функционально связан с активностью резидентных плазмид *Y. pestis* — pMT1, pCD1 и pPCP1. Эти внехромосомные элементы наследственности определяют вирулентные свойства *Y. pestis* [2, 15, 23, 26]. Особенность их функциональной организации заключается в том, что белки, кодируемые плазмидами, не принимают участия в метаболических процессах клетки, а транслируются на внешнюю поверхность клеточной стенки бактерий или же секретируются в окружающую среду [13, 27, 30, 31, 36, 38, 44, 45]. Такая «внеклеточная» локализация белков позволяет им вступать в непосредственный контакт с молекулярными структурами макроорганизма. В зависимости от биохимических свойств полимеров их взаимодействие инициирует развитие патологических процессов различной направленности. Все это давало основание полагать, что процесс токсигенности *Y. pestis* как свойство патогена синтезировать и выделять ЛПС во внешнюю среду может быть сопряжен с системой экспорта белков, кодируемых плазмидами *Y. pestis*. Для проверки этого предположения была изучена способность штаммов *Y. pestis*, содержащих разный состав плазмид, продуцировать внеклеточную форму ЛПС.

Экспериментальная работа выполнена на вакцинном штамме *Y. pestis* EV76 (pMT1, pCD1, pPCP1) и высоковирулентном *Y. pestis* 231 LD₅₀=3 + 20 м. к./мышь

(pMT1, pCD1, pPCP1). Из вакцинного штамма *Y. pestis* EV76 были получены бесплазмидный вариант (pMT1⁻, pCD1⁻, pPCP1⁻) и варианты, содержащие одну из плазмид: *Y. pestis* EV76 (pMT1); *Y. pestis* EV76 (pCD1); *Y. pestis* EV76 (pPCP1). Отсутствие интеграции плазмид с хромосомной ДНК было подтверждено методом ПЦР с праймерами, комплементарными плазмидным генам *cafI* (плазмида pMT1), *lcrV* (плазмида pCD1) и *pla* (плазмида pPCP1). Бесплазмидный вариант штамма *Y. pestis* EV76 депонирован в Государственной Коллекции патогенных бактерий под № КМ 1279 (ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб», г. Саратов). Бесплазмидный вариант вирулентного штамма *Y. pestis* 231 (pMT1⁻, pCD1⁻, pPCP1⁻) любезно предоставлен доктором медицинских наук, профессором А. П. Анисимовым (ГНЦ ПМБ, г. Оболенск). Выбор вакцинного штамма *Y. pestis* EV76 для проведения настоящего исследования не случаен. Клетки этого штамма не способны преодолевать неспецифический иммунный барьер макроорганизма и не вызывают гибели животных при внутрибрюшинном введении дозы $1 \cdot 10^8$ м.к./мышь. В то же время, основной патогенетический фактор — эндотоксин — у этого штамма сохранен и его действие проявляется при внутривенном введении бактерий биопробным животным [49, 50] или же в условиях, описанных нами ранее [14, 16].

Для выяснения вопроса о функциональной взаимосвязи между экспрессией генов резидентных плазмид и токсигенными свойствами *Y. pestis* использовали три методических приема тестирования ЛПС, чувствительность которых и принцип действия различен: модель инфекционно-токсического шока, описанная А.Н. Кравцовым и др. [14, 16], модель сенсбилизации биопробных животных D-галактозамином (D-Gal) [5, 32] и LAL-тест (набор E-TOXATE, Sigma, USA) [43]. Первые два метода позволяют судить о присутствии функционально активной формы ЛПС в среде инкубации бактерий по ее токсичности для биопробных животных, но механизмы действия ЛПС на клетки иммунной системы макроорганизма в этих двух случаях различны. Модель, предложенная Кравцовым А.Н., основана на трансформации ЛПС из биологически инертного в токсически активную форму в условиях *in vitro*. Процесс валиден терминальной стадии инфекции и осуществляется под влиянием БАВ, присутствующего в гемолизованных эритроцитах крови и тканях паренхиматозных органов млекопитающих. В условиях макроорганизма токсическое действие ЛПС реализуется через рецепторный комплекс TLR4/MD2 фагоцитозных клеток и инициирует развитие инфекционно-токсического шока [16, 22]. Чувствительность метода, определенная для ЛПС37 вакцинного штамма *Y. pestis* EV76, который в обычных условиях не токсичен для биопробных животных, составляет LD₅₀ 520 + 610 мкг/мышь [18]. В случае с D-галактозамином (D-GalN) механизм токсического действия ЛПС на макроорганизм иной — провоспалительный цитокин TNF-α, синтез которого индуцирует ЛПС, активирует специфические рецепторы апоптоза исключительно клеток печени (FasR/ApoI), что приводит к гибели гепатоцитов и организма в целом. На фоне D-GalN различия токсических свойств препаратов ЛПС 37 нивелируются. Чувствительность к ЛПС37 вакцинного штамма в условиях D-GalN равна 10 — 20 мкг/мышь [5], т. е. выше приблизительно в 100 раз по сравнению с моделью инфекционно-токсического шока. Оба метода высокоэффективны для детекции свободной формы ЛПС *Y. pestis* в условиях *in vivo*.

Универсальной тест-системой, которая в равной мере чувствует как свободную, так и связанную с клеточной стенкой бактерий форму ЛПС является белковый лизат мечехвоста *Limulus polyphemus*, известный в фармакопейной практике как LAL-тест. Его гемолимфа обладает уникальной способностью переходить в гелеобразное состояние при взаимодействии с липидом А грамотрицательных бак-

терий. Ферментативная система, катализирующая эту реакцию, высокоспецифична и высокочувствительна (0, 125 EU/ml). В экспериментах с препаратами ЛПС *Y. pestis* различной степени токсичности мы установили, что пирогенная активность их одинакова, и минимальная концентрация ЛПС37 *Y. pestis* EV76, катализирующая гелеобразование, составляет 10 мкг/мл.

Все эксперименты были выполнены на клетках *Y. pestis*, выращенных на плотной питательной среде при 37 °С в течение 18 — 24 часов. В случае использования модели инфекционно-токсического шока клетки *Y. pestis* инкубировали в гемолизированных эритроцитах крови человека, как описано А.Н. Кравцовым и др. [14]. При использовании LAL-теста и модели D-GalN внеклеточную форму ЛПС тестировали в супернатантах и фильтратах клеток *Y. pestis*, полученных следующим образом. Клетки *Y. pestis*, выращенные при 37 °С в течение 18-24 ч, суспендировали в физиологическом растворе NaCl (1×10^{10} м.к./мл), полученную взвесь инкубировали 3 часа при 37 °С, инактивировали клетки кипячением в течение 30 мин и осаждали центрифугированием при 12000 об./мин в течение 5 мин. Супернатант содержал 1×10^3 — 1×10^4 м.к./мл. Для полного удаления клеток пробы фильтровали через стерильные мембранные фильтры Millex GR (0,22 μ m, «Merck» Millipore Ltd). О присутствии функционально активной формы ЛПС на моделях инфекционно-токсического шока и D-GalN судили по гибели животных в течение первых двух суток наблюдения (в тексте представлены выраженные в процентах крайние значения гибели животных, полученные в серии экспериментов).

Для выяснения принципиального вопроса — играют ли роль резидентные плазмиды *Y. pestis* в образовании внеклеточной формы ЛПС — на первом этапе работы были изучены токсигенные свойства штаммов *Y. pestis* EV76 (pMT1, pCD1, pPCP1) и *Y. pestis* 231 (pMT1, pCD1, pPCP1), содержащих полный набор плазмид, и их бесплазмидных вариантов: *Y. pestis* EV76 (pMT1⁻, pCD1⁻, pPCP1⁻) и *Y. pestis* 231⁻ (pMT1⁻, pCD1⁻, pPCP1⁻). Объектом исследования являлись супернатанты клеток и их бесклеточные фильтраты, полученные в описанных выше условиях. Результаты проведенных экспериментов свидетельствуют о том, что токсигенные свойства полноценного и бесплазмидного вариантов *Y. pestis* отличаются друг от друга и эти различия имеют не количественный, а качественный характер. Так, все тест-системы регистрируют ЛПС в супернатантах и фильтратах клеток *Y. pestis* EV 76 и *Y. pestis* 231, имеющих полноценный набор плазмид. На моделях инфекционно-токсического шока и D-GalN это выражалось в гибели 80 — 100% биопробных животных в течение первых двух суток наблюдения. Ферментативный LAL-тест регистрировал в фильтратах вакцинного штамма активность ЛПС, равную 32,05 EU/ml. В то же время, супернатанты и фильтраты бесплазмидных вариантов *Y. pestis* EV76 и *Y. pestis* 231 не токсичны для мышей и реакция с LAL-тестом давала отрицательный результат. На модели биопробных животных столь же четкие различия токсигенных свойств были выявлены между живыми и убитыми кипячением клетками полноценного вакцинного штамма *Y. pestis* EV76. Среда инкубации живых бактерий была токсичной для мышей, а супернатанты и фильтраты, полученные после инкубации инактивированных клеток, токсическим эффектом не обладали. Качественные различия между полноценными и бесплазмидными вариантами *Y. pestis* EV76 подтверждают также результаты опытов по внутривенному введению культур биопробным животным. Введение клеток полноценного вакцинного штамма *Y. pestis* EV76 в хвостовую вену в количестве $1 \cdot 10^8$ м. кл. вызывало развитие типичного инфекционного процесса. Бесплазмидные варианты *Y. pestis* в тех же условиях не проявляли токсических свойств, и гибели животных не наблюдалось [6, 11, 19].

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о функциональной взаимосвязи между резидентными плазмидами и процессом токсигенности *Y. pestis*. Впервые установлено, что клетки *Y. pestis*, содержащие полноценный набор плазмид, способны освобождать ЛПС во внешнюю среду, и этот процесс не связан с разрушением бактерий, а является функцией живых клеток возбудителя чумы. Варианты *Y. pestis*, лишенные внехромосомных элементов наследственности, такой способностью не обладают. Видимо, процесс сопряжен с транслокацией белков, кодируемых плазмидами pMT1, pCD1, pPCP1, на поверхность клетки либо во внешнюю среду. Можно было а priori предположить, что перемещение ЛПС-белкового комплекса изменяет архитектуру внешней мембраны клетки. В этом случае клетки *Y. pestis*, содержащие и не содержащие плазмидные репликоны, могут существенно различаться не только по количественно-качественному составу белков внешней мембраны, но возможно, и по стерической ориентации молекул ЛПС. Для проверки этого предположения изучили способность ферментов LAL-теста реагировать непосредственно с ЛПС клеточной стенки бактерий чумы. Опыты были выполнены на интактных и инактивированных кипячением клетках вакцинного штамма *Y. pestis* EV76 с полноценным составом плазмид и с его бесплазмидным вариантом. Как выяснилось, ферментативный каскад LAL-теста вступает в реакцию с ЛПС клеточной стенки бактерий, имеющих полноценный набор плазмид. При этом положительная реакция отмечается в пробах как с интактными, так и с инактивированными клетками *Y. pestis* EV76. Чувствительность реакции очень высокая, гелеобразование наблюдается в пробах, содержащих 10 м.к./мл. В экспериментах с бесплазмидным вариантом *Y. pestis* EV76 ЛПС не тестируется ни в свободном, ни в связанном состоянии [19].

Видимо, в клетках *Y. pestis* EV76, лишенных плазмид, стерическое расположение молекул ЛПС типично для грамотрицательных бактерий. Цепи ЛПС формируют упорядоченную структуру со строгой ориентацией полярных/неполярных полюсов полимера. При этом полисахаридная часть направлена на внешнюю сторону бактериальной клетки, а базальная зона и гликолипидная область ЛПС максимально удалены от наружной поверхности и связаны как с цитоплазматической мембраной, так и с пептидогликаном клеточной стенки. При такой ориентации молекул ЛПС доступность липида А (даже в случае R-хемотипа ЛПС) для взаимодействия с белками-ферментами, расположенными за пределами бактериальной клетки, весьма ограничена. У бактерий *Y. pestis*, имеющих стандартный набор плазмид, архитектура клеточной стенки определяется белками, кодируемыми плазмидами pMT1, pCD1 и pPCP1. Видимо, при образовании ЛПС-белкового комплекса в силу стереохимических особенностей полимеров происходит изменение пространственной ориентации молекулы ЛПС. В результате инверсии полярных/неполярных полюсов гликолипидная область ЛПС экспонируется на внешней мембране клеток и стерически становится доступной для взаимодействия с ферментативной системой LAL-теста. Вопрос о молекулярных механизмах этого процесса может быть предметом специальных исследований. В рамках настоящей работы была предпринята попытка оценить роль каждой из плазмид в реализации токсигенных свойств *Y. pestis*.

На модели D-GalN и инфекционно-токсического шока установлено, что токсичность среды инкубации клеток *Y. pestis* EV76, содержащих различный набор плазмид, достоверно отличается друг от друга и варьирует в пределах от 0 до 100%. Так, супернатанты и фильтраты полноценного штамма *Y. pestis* EV76 вызывают 80—100% гибель животных в течение первых двух суток наблюдения. После введения мышам супернатанта/фильтрата *Y. pestis* EV76 (pCD1), содержащего плазми-

ду кальцийзависимости, погибало от 40 до 60 % животных, вариант *Y. pestis* EV76 (pMT1) вызывал гибель 10 — 20% мышей. При введении супернатанта/фильтрата *Y. pestis* EV76 (pPCP1), содержащего только плазмиду пестициногенности, гибели животных вообще не наблюдалось. Супернатант бесплазмидного варианта *Y. pestis* EV76 (pMT1, pCD1, pPCP1) в аналогичных условиях также не обладает токсическими свойствами [6, 11]. Данные, полученные на модели биопробных животных, полностью совпадают с результатами экспериментов с использованием LAL-теста. Супернатанты/фильтраты клеток *Y. pestis* EV76, содержащих полный набор плазмид, и изогенные варианты штамма *Y. pestis* EV76, имеющие по одной плазмиде — pCD1 или же pMT1, в LAL-тесте дают положительный результат. Согласно результатам ЛАЛ-теста, количество ЛПС в супернатантах *Y. pestis* EV76 (pMT1, pCD1, pPCP1) равно 32,05(EU/ml), соответственно в супернатантах *Y. pestis* EV76 (pCD1) — 16,02 (EU/ml) и в супернатантах *Y. pestis* EV76 (pMT1) — 8,00 (EU/ml). В супернатантах/фильтратах клеток штаммов *Y. pestis* EV76 с плазмидой pPCP1 и бесплазмидного варианта ЛПС не выявляется [19].

Таким образом, установлено, что отделение ЛПС от клеточной мембраны бактерий во внешнюю среду происходит под влиянием белков, кодируемых плазмидами *Y. pestis*. При этом процесс ЛПС-белковых взаимодействий является основополагающим. В зависимости от химической структуры биополимеров их соединение может изменять функциональную активность как ЛПС, так и белковой молекулы. Наиболее изучен в настоящее время комплекс высокотемпературного ЛПС с Pla белком плазмиды пестициногенности pPCP1, ассоциация которых приводит к ЛПС-зависимому фолдингу Pla [9, 36, 47]. Результаты наших опытов предполагают, что химическая связь между белком Pla и ЛПС в этом комплексе осуществляется через липид А, что блокирует его функционально активные группы. Возможность ассоциации ЛПС с MT была установлена нами ранее. В этом комплексе, в отличие от ЛПС-Pla, связь осуществляется через коровую область ЛПС, в результате чего высокотемпературный ЛПС трансформируется из неактивной в токсически активную форму [17, 18].

Участие белков, кодируемых плазмидой pCD1, в реализации токсического потенциала ЛПС установлено нами впервые. Плазида кальцийзависимости pCD1, как известно, определяет синтез более чем 25 белков различного функционального действия (структурные белки аппарата секреции T3SS, эффекторные Yops и регуляторные белки) [3, 27, 30, 44, 46]. На основании имеющихся данных не представляется возможным сказать, какие из белков взаимодействуют с ЛПС. В настоящий момент можно лишь констатировать тот факт, что белки, кодируемые pCD1, вносят максимальный вклад в активацию высокотемпературного ЛПС *Y. pestis* и способствуют переводу его в экстрацеллюлярную форму.

Обращает на себя внимание тот факт, что в комплексе ЛПС-белок белковый компонент является переменной величиной и может быть представлен Pla, MT и белком/белками pCad. В то время как ЛПС — консервативная часть комплекса и химическая структура высокотемпературного ЛПС играет исключительную роль в формировании внеклеточной формы ЛПС. По данным Montminy S. et al. генетический мутант вирулентного штамма *Y. pestis* KIM1001-pLpxL с конститутивным синтезом гексагональной формы липида А (аналог ЛПС26) утрачивает вирулентные свойства для биопробных животных при наличии всех известных детерминант вирулентности [42]. В то же время, такой же по структуре ЛПС37, выделенный из бактерий аттенуированного штамма *Y. pestis* KIM5-pLpxL, активизирует TLR4/MD2 рецептор и обладает выраженной цитокинпродуцирующей способностью. Видимо,

мутант вирулентного штамма *Y. pestis* KIM1001-pLpxL имеющий ЛПС низкотемпературного строения, утрачивает свойства токсигенности.

Переход ЛПС от связанного к свободному состоянию — это центральный момент патогенетического действия ЛПС, и особая роль в реализации этого процесса принадлежит, по нашему мнению, капсульному веществу *Y. pestis*. Результаты экспериментов ряда исследователей свидетельствуют о том, что капсула является носителем токсина чумного микроба [10, 12, 13, 24]. Предполагаем, что при отделении капсульного вещества от клеток все биомолекулы, находящиеся на поверхности внешней мембраны и не имеющие ковалентной связи с близлежащими полимерами, включая молекулы ЛПС, «стягиваются» вместе с капсулой в окружающую среду. Накопление ЛПС в составе капсульной субстанции происходит пропорционально росту и размножению бактерий в организме инфицированного хозяина. По мере отделения от бактериальной клетки под воздействием литических ферментов и БАВ макроорганизма упорядоченная структура капсулы нарушается. При этом происходит разрыв слабых связей между полимерами и устанавливаются новые межмолекулярные взаимодействия в соответствии с законами биоэнергетики. Токсически активная форма ЛПС в этой гетерогенной системе может быть представлена как комплексом ЛПС-белок макроорганизма (ЛПС-LBP), так и комплексами ЛПС с белками *Y. pestis* (ЛПС-МТ и ЛПС-белок/белки PCD1). Дублирование функции гарантирует надежность системы в целом, в данном случае — токсического эффекта ЛПС. Дальнейшее взаимодействие ЛПС-белковых комплексов с TLR4/MD2 миелоидных клеток макроорганизма канонично и осуществляется по схемам, описанным ранее [22]. Трансформация функциональных свойств ЛПС *Y. pestis* от структурного компонента клеточной стенки бактерий до биологически активного полимера токсического действия, изложенная в настоящем обзоре, может служить ярким примером суммарного эффекта взаимодействия физических и химических факторов макро- и микроорганизмов. Динамику этого процесса можно представить следующим образом: экспрессия генов *Y. pestis* высокотемпературного генотипа [33, 39] —> взаимодействие полимеров, синтез которых детерминирован хромосомными и плазмидными репликациями с образованием ЛПС-белковых комплексов —> транслокация этих комплексов на поверхность клеточной стенки бактерий —> аккумуляция ЛПС в составе капсульного вещества *Y. pestis* и отделение капсулы от бактериальной клетки —> активация ЛПС-белковых комплексов, содержащихся в составе капсульного вещества, биологически активными факторами макроорганизма.

Таким образом, экспериментальные данные, представленные в настоящем обзоре, свидетельствуют о том, что процесс токсигенности *Y. pestis* как способность патогена синтезировать и продуцировать токсин в окружающую среду высокоспецифичен и в полной мере отражает биологическую уникальность *Y. pestis*.

ЛИТЕРАТУРА

1. Андриюков Б.Г., Сомова А.М., Тимченко Н.Ф. Исследование температурозависимых молекулярных механизмов развития инфекций — ключ к созданию современных профилактических средств. СТМ. 2016, 8(3):137-150.
2. Анисимов А. П. Факторы *Yersinia pestis*, обеспечивающие циркуляцию и сохранение возбудителя чумы в экосистемах природных очагов. Сообщение 1. Мол. генетика, микробиол. и вирусол. 2002, 3:3-23.
3. Бывалов А.А., Оводов Ю.С. Иммунобиологические свойства антигенов *Yersinia pestis*. Биоорганическая химия. 2011, 37(4):452-463.
4. Гремякова Т. А. Структурно-функциональная вариабельность антигенов *Yersinia pestis* и методология конструирования противочумных иммунопрофилактических препаратов. Автореф. дисс. докт. мед. наук. Оболенск, 2003.

5. Демидова Г.В., Зюзина В.П., Соколова Е.П., Пасюкова Н.И., Беспалова И.А., Бородина Т.Н., Тынянова В.И. Токсичность различных форм липополисахаридов *Y. pestis* для белых мышей, сенсibilизированных Д-галактозамином. Проблемы особо опасных инфекций. 2014, 4:75-77.
6. Демидова Г.В., Соколова Е.П., Зюзина В.П., Рыкова В.А., Морозова И.В., Подладчикова О.Н., Тынянова В.И. Влияние внехромосомных элементов наследственности на токсические свойства *Yersinia pestis*. Журн. микробиол. 2017, 2:28-33.
7. Дмитровский А. М. Токсический компонент патогенеза чумного инфекционного процесса: инфекционно-токсический шок. Профилактика и меры борьбы с чумой. Алматы, 1994.
8. Домарадский И.В. Очерки патогенеза чумы М., Медицина, 1966.
9. Евсеева В. В. Платонов М. Е., Копылов П. Х., Дентовская С. В., Анисимов А. П. Активатор плазмидогена чумного микроба. Инфекция и иммунитет. 2015, 5(1):27-36.
10. Желтенков А. И. О токсине чумного микроба и антитоксических противочумных сыворотках. Журн. микробиол. 1946, 3:81-82.
11. Зюзина В.П., Демидова Г.В., Соколова Е.П., Рыкова В.А., Бородина Т.Н., Подладчикова О.Н., Тынянова В.И. Роль резидентных плазмид в проявлении токсических свойств липополисахарида чумного микроба. В: Обмен веществ при адаптации и повреждении. Дни молекулярной медицины на Дону. Ростов-на-Дону, РостГМУ. 2016:20-24.
12. Исин Ж.М., Тугамбаев Т.И. Структурно-функциональные свойства и биологическая активность капсульного антигена, «мышинного» токсина и эндотоксина *Yersinia pestis*. Журн. микробиол. 1987, 4:91-98.
13. Кадникова Л. А., Копылов П. Х., Дентовская С. В., Анисимов А. П. Капсульный антиген чумного микроба. Инфекция и иммунитет. 2015, 5(3):201-218.
14. Кравцов А. Н. Тынянова В. И., Зюзина В. Повышение вирулентности бактерий *Yersinia pestis* при инкубации клеток в гемолизированных эритроцитах крови человека. Журн. микробиол. 1993, 4:3-6.
15. Подладчикова О.Н. Современные представления о молекулярных механизмах патогенеза чумы. Проблемы особо опасных инфекций. 2017, 3:33-40.
16. Рыжко И. В., Мишанькин М. Б., Тынянова В. И., Цураева Р. И., Молдован И.А. Способ прогнозирования клинической эффективности антибактериальных, вакцинных препаратов, средств пассивной антитоксической иммунотерапии на модели инфекционно-токсической формы чумы у мышей. Патент № 2303821 от 27.07.2007.
17. Соколова Е. П., Марченков В. И., Демидова Г. В., Зюзина В.П., Беспалова И.А., Павлович Н.В., Еременко Н.С., Веркина Л.М., Тынянова В.И. Комплексы «мышинного» токсина чумного микроба с модифицированными формами липополисахарида *Yersinia pestis* и с липополисахаридами других бактерий. Биотехнология. 2001, 4:53-58.
18. Соколова Е. П. Механизмы активации токсических субстанций чумного микроба. Автореф. дис. канд. биол. наук. Ростов-на-Дону, 2002.
19. Соколова Е.П., Зюзина В.П., Демидова Г.В., Подладчикова О.Н., Рыкова В.А., Тынянова В.И. Роль резидентных плазмид rMT1, pCD1, rPCP1 *Yersinia pestis* в образовании экстрацеллюлярной формы липополисахарида. Проблемы особо опасных инфекций. 2017, 3:85-89.
20. Тынянова В.И., Демидова Г.В., Зюзина В.П., Плетницкий А.Э., Подладчикова О.Н., Гончаров Е.К., Кубанцева Е.П., Беспалова И.А. Влияние биологически активного вещества, усиливающего токсичность чумного микроба, на физико-химические свойства его капсульной субстанции. Биотехнология. 1996, 8:26-30.
21. Тынянова В.И., Демидова Г.В., Зюзина В.П., Анисимов Б.И., Плетницкий А.Э. Гликолипид — биоактиватор токсических субстанций чумного микроба. Биотехнология. 1999, 2:28-33.
22. Тынянова В.И., Зюзина В.П., Демидова Г.В., Соколова Е.П. Специфичность иммуномодулирующего действия эндотоксина чумного микроба. Журн. микробиол. 2016, 3:104-112.
23. Ценева Г.Я., Солодовникова Н.Ю., Воскресенская Е.В. Молекулярные аспекты вирулентности иерсиний. Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. 2002, 4(3):248-266.
24. Andrews G.P., Heath D.G., Anderson G.W. et al. Fraction I capsular antigen (FI) purification from *Yersinia pestis* CO92 and from an *Escherichia coli* recombinant strain and efficacy against lethal plague challenge. Infect. Immun. 1996, 64(6):2180-2187.
25. Botos I., Majdalani N., McCarthy J.G. et al. Structural and functional characterization of the LPS transporter LptDE from gram-negative pathogens. Structure. 2016, 24(6):965-976.

26. Brubaker R.R. Physiology of *Yersinia pestis*. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2016, 918:79-99.
27. Dewoody R.S., Merritt P.M., Marketon M.M. Regulation of the *Yersinia* type III secretion system: traffic control. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2013, 6, 3:4. doi: 10.3389.
28. Dodd D.C., Eisenstein B.I. Dependence of secretion and assembly of type I fimbrial subunits of *Escherichia coli* on normal protein export. *J. Bacteriol.* 1984, 159(3):1077-1079.
29. Eddy J., Gielda L., Caulfield A. et al. Production of outer membrane vesicles by the plague pathogen *Yersinia pestis*. *PLoS One.* 2014, 9 (9): e 107002.
30. Edgren T., Forsberg A., Rosqvist R., Wolf-Watz H. Type III secretion in *Yersinia*: injectisome or not. *PLoS Pathog.* 2012, 8 (5): e1002669.
31. Eren E., van den Berg B. Structural basis for activation of an integral membrane protease by lipopolysaccharide. *J. Biol. Chem.* 2012, 8:23971-23976.
32. Galanos C., Freudenberg M. A., Reuter W. Galactosamine-induced sensitization to the lethal effects of endotoxin. *Proc. Natl. Acad. Sci USA.* 1979, 76:5939-5943.
33. Han Y., Fang H., Liu L., Zhou D. Genetic regulation of *Yersinia pestis*. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2016, 918:233-256.
34. Huang H.Z., Nicolich M., Linder L. Current trends in plague research: from genomics to virulence. *Clin. Med. Res.* 2006, 4(3):1189-1199.
35. Kawahara K., Tsukano H., Watanabe H. et al. Modification of the structure and activity of lipid A in *Yersinia pestis* lipopolysaccharide by growth temperature. *Infect. Immun.* 2002, 70(8):4092-4098.
36. Ke Y., Chen Z., Yang R. *Yersinia pestis*: mechanisms of entry into and resistance to the host cell. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2013, Dec; 24(3):106.
37. Knirel Y.A., Linder B., Vinogradov E.V. et al. Temperature dependent variations and intraspecies diversity of the structure of the lipopolysaccharides of *Yersinia pestis*. *Biochemistry.* 2005, 44:1731-1743.
38. Knirel Y.A., Anisimov A.P. Lipopolysaccharide of *Yersinia pestis*, the cause of plague: structure, genetics, biological properties. *Acta Naturae.* 2012, 4(3):46 — 58.
39. Liu L., Fang H., Yang H. et al. Reciprocal regulation of *Yersinia pestis* biofilm formation and virulence by RovM and RovA. *Open Biol.* 2016, 6 (3).pii:150198.
40. Matsuura M., Takahashi H., Watanabe H. et al. Immunomodulatory properties of *Yersinia pestis* lipopolysaccharides on human macrophages. *Clin. Vaccine Immunol.* 2010, 17(1):49-55.
41. Matsuura M. Structural Modifications of bacterial lipopolysaccharide that facilitate gram-negative bacteria evasion of host innate immunity. *Front. Immunol.* 2013, 4:109-113.
42. Montminy S., Khan N., McGrath S. et al. Virulence factors of *Yersinia pestis* are overcome by a strong lipopolysaccharide response. *J. Nature Immun.* 2006, 7(10):1066-1073.
43. Munford R. Endotoxemia—menace, marker, or mistake? *J. Leukoc Biol.* 2016 Oct; 100(4):687-698.
44. Pha K., Navarro L. *Yersinia* type III effectors perturb host innate immune responses. *World J. Biol. Chem.* 2016, 7(1):1-13.
45. Runco L.M., Myrczek S., Bliska J.B., Thanassi D.G. Biogenesis of the FI capsule and analysis of the ultrastructure of *Yersinia pestis*. *J. Bacteriol.* 2008, 190 (90):3391-3385.
46. Schneewind O. Classic spotlight: Studies on the low-calcium response of *Yersinia pestis* reveal the secrets of plague pathogenesis. *J. Bacteriol.* 2016, 198(15):2018.
47. Suomalainen M., Lobo L., Brandenburg K. et al. Temperature-induced changes in the lipopolysaccharide of *Yersinia pestis* affect plasminogen activation by the Pla surface protease. *Infect. Immun.* 2010, 78(6):2644-2652.
48. Straus D.C., Atkisson D.L., Garner C.W. Importance of a lipopolysaccharide-containing extracellular toxic complex in infections produced by *Klebsiella pneumoniae*. *Infection Immun.* 1985, 50(3):787-795.
49. Une T., Brubaker R. Roles of V antigen in promoting virulence and immunity in *Yersinia*. *J. Immunol.* 1984, 133:2226-2230.
50. Yang H., Wang T., Tian G. et al. Host transcriptomic responses to pneumonic plague reveal that *Yersinia pestis* inhibits both the initial adaptive and innate immune responses in mice. *Int. J. Med. Microbiol.* 2017, 307 (1):64-74.

Поступила 26.07.18

Контактная информация: Демидова Галина Викторовна, к.б.н.,
344002, Ростов-на-Дону, ул. М. Горького, 117/40, р.т. (863)240-27-03