

2. Бондаренко В.М. Роль условно-патогенных бактерий при хронических воспалительных процессах различной локализации. М., Триада, 2011.
3. Григоренко Д. Е., Сапин М. Р. Перестройка лимфоидных структур селезенки у песчанок после космического полета. Морфология. 2012, 142 (4): 67-71.
4. Кобатов А.И., Вербицкая Н.Б., Добролеж О.В., Рыбальченко О.В., Петров Л.Н. Изучение пробиотических характеристик *Lactobacillus acidophilus*, выращенных в условиях космического полета. Медицина экстремальных ситуаций. 2008, 4 (26): 66- 78.
5. Пономарев С. А., Антропова Е. Н., Берендеева Т. А. и др. Особенности изменений показателей врожденного иммунитета при воздействии на организм человека неблагоприятных факторов длительного космического полета. Авиакосм. экол. мед. 2013, 47 (4): 123-124.
6. Потапов А. Н., Синяк Ю. Е., Петров В. М. Проблемы медико-биологического обеспечения межпланетных экспедиций. Авиакосм. экол. мед. 2013, 47 (1): 55-60.
7. Рыбальченко О.В. Электронно-микроскопическое исследование межклеточных взаимодействий микроорганизмов при антагонистическом характере взаимоотношений. Микробиология. 2006, 75 (4): 550-555.
8. Рыбальченко О.В., Бондаренко В.М., Гуслева О.Р. и др. Дезорганизация биопленок клинических штаммов стафилококков метаболитами лактобацилл. Журн. микробиол. 2010, 6: 66-70.
9. Branda S.S., Vik A., Friedman L., Kolter R. Biofilms: the matrix revised. Trends Microbiol. 2005, 13: 21-25.
10. Donald R.M., Costerton J.W. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. Clin. Microbiol. Rev. 2002, 15: 167-193.
11. Macfarlane S. Microbial biofilm communities in the gastrointestinal tract. J. Clin. Gastroenterol. 2008, 242 (3): S142-S143.
12. Miller M.B., Bassler B.L. Quorum sensing in bacteria. Ann. Rev. Microbiol. 2001, 55: 165-199.
13. Novikova N.D. Review of the knowledge of microbial contamination of the russian manned spacecraft. Microb. Ecol. 2004, 47: 127-132.
14. Olson M.E., Ceri H., Morck D.W. et al. Biofilm bacteria: formation and comparative susceptibility to antibiotics. Can. J. Vet. Res. 2002, 66: 86-92.
15. Popat R., Crusz S., Doggle S. The social behaviours of bacterial pathogens. Brit. Med. Bullet. 2008, 87: 63-75.
16. Pratt L.A., Kolter R. Genetic analysis of *Escherichia coli* biofilm formation: roles of flagella, motility, chemotaxis and type I pili. Mol. Microbiol. 1998, 30: 285-294.
17. Rybalchenko O., Bondarenko V., Rozlomi V., Orlova O. Ultrastructural organization of biofilms of opportunistic microorganisms — representatives of gut human microbiota. Genes Nutrition. 2010, 1.5: S92.

Поступила 25.05.16

Контактная информация: Рыбальченко Оксана Викторовна, д.б.н., проф., 199034, Санкт-Петербург, Университетская наб., 7-9, р.т. (812)328-20-00

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2016

Н.А.Терентьева¹, Н.Ф.Тимченко², В.А.Голотин^{1,3}, В.А.Рассказов¹

БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ТОКСИНОВ *YERSINIA PSEUDOTUBERCULOSIS*

¹Тихоокеанский институт биоорганической химии, ²НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.П.Сомова, ³Дальневосточный федеральный университет, Владивосток

Цель. Исследование влияния термолabileного (ТЛТ) и термостабильного (ТСТ) летальных токсинов *Yersinia pseudotuberculosis* на развитие эмбрионов морского ежа *Strongylocentrotus intermedius*, процессы биосинтеза нуклеиновых кислот и белка в клетках эмбрионов и активность нуклеозидкиназ морского ежа. *Материалы и методы.* Для выделения ТЛТ и ТСТ использовали штаммы *Y. pseudotuberculosis* 2517 (pYV-) и 512 (pYV48МД,

pYV82MD). Для проведения экспериментов и выделения нуклеозидкиназ использовали гаметы и эмбрионы морского ежа *S. intermedius*. **Результаты.** Оба изученных токсина *Y. pseudotuberculosis* обладали спермиотоксичным действием и снижали оплодотворяющую способность спермиев морского ежа. LD₅₀ ТЛТ составила 1 мкг/мл, а ТСТ — 2 мкг/мл. Токсины влияли на развитие эмбрионов морского ежа, вызывая тяжелые морфологические повреждения, остановку развития эмбрионов на ранних этапах эмбриогенеза, разрушение клеток и гибель эмбрионов. При этом повреждающее действие ТЛТ наблюдалось при более низких его концентрациях по сравнению с ТСТ. ТЛТ ингибировал биосинтез ДНК и РНК при концентрациях 1 — 2 мкг/мл. ТСТ не оказывал влияния на биосинтез нуклеиновых кислот даже в высоких концентрациях, но ингибировал биосинтез белка в эмбрионах морского ежа. ТЛТ не снижал уровня включения меченых аминокислот клетками эмбрионов. ТЛТ оказывал ингибирующее действие на активность тимидин- и уридинкиназы морского ежа, тогда как ТСТ не влиял на активность этих ферментов. **Заключение.** Оба белковых токсина *Y. pseudotuberculosis* влияют на развитие эмбрионов морского ежа, однако механизмы воздействия ТЛТ и ТСТ на эмбрионы и протекающие в них процессы различаются.

Журн. микробиол., 2016, № 6, С. 10—19

Ключевые слова: *Yersinia pseudotuberculosis*, токсины, эмбрионы морского ежа *Strongylocentrotus intermedius*, биосинтез ДНК, РНК, белка, нуклеозидкиназы

*N.A. Terentjeva*¹, *N.F. Timchenko*², *V.A. Golotin*^{1,3}, *V.A. Rasskazov*¹

BIOLOGICAL ACTIVITY OF *YERSINIA PSEUDOTUBERCULOSIS* TOXINS

¹Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, ²Somov Research Institute of Epidemiology and Microbiology, ³Far-Eastern Federal University, Vladivostok, Russia

Aim. Study of effect of heat-labile (HLT) and thermostable (HST) lethal toxins of *Yersinia pseudotuberculosis* on the development of embryos of sea urchin *Strongylocentrotus intermedius*, processes of biosynthesis of nucleic acids and protein in embryo cells and activity of nucleoside-kinases of sea urchin. **Materials and methods.** *Y. pseudotuberculosis* strains 2517 (pYV-) and 512 (pYV48MD, pYV82MD) were used for isolation of HLT and HST. Gametes and embryos of sea urchin *S. intermedius* were used to carry out the experiments and isolate nucleoside-kinases. **Results.** Both of the studied toxins of *Y. pseudotuberculosis* possessed spermiotoxic effect and reduced fertilizing ability of sea urchin spermies. HLT LD₅₀ was 1 µg/ml, and HST — 2 µg/ml. Toxins affected the development of embryos of sea urchin resulting in severe morphologic damages, cessation of the development of embryos at early stages of embryogenesis, destruction of cells and death of embryos. Wherein, damaging effect of HLT was observed at lower concentrations compared with HST. HLT inhibited DNA and RNA biosynthesis at concentrations of 1-2 µg/ml. HST did not affect biosynthesis of nucleic acids even at high concentrations, but inhibited protein biosynthesis in sea urchin embryos. HLT did not reduce the level of inclusion of labeled amino acids into embryo cells. HLT had inhibiting effect on the activity of thymidine- and uridine-kinase of sea urchin, whereas HST did not affect these enzymes. **Conclusion.** Both of *Y. pseudotuberculosis* protein toxins affect the development of sea urchin embryos, however, mechanisms of action of HLT and HST on embryos and processes occurring in them differ.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2016, No. 6, P. 10—19

Key words: *Yersinia pseudotuberculosis*, toxins, embryos of *Strongylocentrotus intermedius* sea urchin, DNA, RNA, protein biosynthesis, nucleoside-kinases

ВВЕДЕНИЕ

Бактерии рода *Yersinia* широко распространены в окружающей среде, они изолированы из различных биотических и абиотических объектов [2]. Микроорганизмы способны проникать в клетки экто- и эндотермных орга-

низмов и растений, размножаться в тканях различных органов, продуцировать токсины, оказывать токсический эффект и вызывать гибель клеток [8]. Эти бактерии реализуют потенциал патогенности (адгезивность, инвазивность) в клетках организмов, повреждают их, размножаются в тканях различных органов, продуцируют токсины [8].

К настоящему времени есть сведения о нескольких токсинах *Yersinia pseudotuberculosis* [3 — 5, 12 — 14]. В данной работе представлены сведения о биологической активности термолабильного летального токсина (ТЛТ) и термостабильного летального токсина (ТСТ) *Y. pseudotuberculosis*. Эти токсины отличаются друг от друга по молекулярной массе, отношению к температуре, биологическим свойствам. Однако роль этих токсинов бактерий псевдотуберкулеза в патогенезе болезни не ясна. Остаются малоизвестными их мишени и механизм действия на клетки макроорганизма.

Целью настоящей работы явилось изучение влияния ТЛТ и ТСТ *Y. pseudotuberculosis* на гамету и развитие эмбрионов морского ежа *Strongylocentrotus intermedius*, а также процессы биосинтеза клеточных биополимеров, протекающие в эмбрионах.

Гаметы и эмбрионы морского ежа широко используются как модельная система для биотестирования различных соединений, в том числе для исследований в областях фармакологии и токсикологии [1]. На ранних стадиях развития в клетках эмбрионов протекает интенсивный и достаточно синхронный синтез нуклеиновых кислот. Обладая способностью развиваться в морской среде без каких-либо добавок, эмбрионы могут включать экзогенные предшественники в состав клеточных биополимеров. Это дает возможность исследовать протекающие в эмбриональных клетках процессы биосинтеза нуклеиновых кислот и других важных биомолекул, а также действие различных агентов на эти процессы.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали штамм *Y. pseudotuberculosis* 2517 O3 серотипа (Mollaret H., Франция), утративший плазмиду вирулентности (pYV-), и штамм 512, несущий плазмиды pYV48МД и pVM82МД. Токсины ТЛТ и ТСТ получены по методам, описанным Тимченко Н.Ф. и др. [8]. Для проведения экспериментов были использованы морские ежи *S. intermedius*, отловленные в заливе Петра Великого (Японское море). В процессе исследования использовали шейкер S-3.02.10М (Латвия), микроскоп с фотоаппаратом Motic AE21.

В работе использованы следующие реактивы: реактивы квалификации хч, [³H]-тимидин, [³H]-уридин, [³H]-аланин или [³H]-лейцин (Изотоп, Россия); DEAE-целлюлоза, DEAE-бумага и GF/C-фильтры (Whatman, Англия), DEAE-toyopearl (Toyo-Soda, Япония); blue sepharose (Amersham Biocsciences).

Яйцеклетки получали путем встряхивания морских ежей и стимуляции икрометания введением в целомическую полость ежа 1 мл 0,5 М КСl. Яйцеклетки собирали в стеклянные стаканы объемом 100 мл с морской водой. Осевшую икру отмывали от КСl профильтрованной морской водой. Сперму получали, сильно встряхивая самцов морских ежей.

Для оплодотворения к суспензии яйцеклеток в морской воде при мягком перемешивании добавляли сперму. Количество подбирали таким образом, чтобы на 1 яйцеклетку приходилось около 500 спермиев. Степень оплодотво-

рения определяли под микроскопом. Во всех экспериментах оплодотворение яйцеклеток составляло более 95%. Оплодотворенные яйцеклетки отмывали фильтрованной морской водой от излишков спермы.

Спермиотоксичность определяли, добавляя к спермиям в морской воде (1 ОЕ при 260 нм) разные концентрации токсинов (от 0,05 до 8 мкг/мл) и выдерживая 20 мин при 20°C. Затем к 1 мл неоплодотворенных яйцеклеток добавляли спермии, подсчитывали % оплодотворения яйцеклеток и наблюдали за дальнейшим развитием эмбрионов. Определяли концентрацию токсинов, при которой обработанные сперматозоиды оплодотворяли 50% яйцеклеток.

Для определения эмбриотоксичности к оплодотворенным и отмывым от избытка спермы яйцеклеткам добавляли токсины в концентрациях от 0,05 до 2 мкг/мл. Эмбрионы инкубировали при 20 — 22°C и непрерывном перемешивании. За развитием эмбрионов морского ежа наблюдали под микроскопом при увеличении (окуляр х объектив) 10x40 в течение 72 часов.

Для исследования биосинтеза нуклеиновых кислот использовали [³H]-тимидин и [³H]-уридин, для изучения биосинтеза белка — [³H]-аланин или [³H]-лейцин [9]. Меченые нуклеозиды или аминокислоты добавляли к суспензии эмбрионов до концентрации 5 мКи/мл. Через 1, 2, 4, 6, 24 часа с момента оплодотворения отбирали аликвоты по 0,2 мл и определяли радиоактивность в толуольном сцинтилляторе на жидкостном альфа-бета радиометре Tri-Carb (PerkinElmer).

Нуклеозидкиназы выделяли из яйцеклеток морского ежа, хранившихся при -40°C. Яйцеклетки размораживали, гомогенизировали в 20 мМ Трис-НСl, рН 7,5 и центрифугировали при 6000 g в течение 20 мин. Экстракт наносили на колонку (2,6 x 35 см) с ДЭАЭ-целлюлозой, предварительно уравновешенную тем же буфером, со скоростью 60 мл/ч. Колонку промывали 400 мл Трис-НСl буфера рН 7,5, и адсорбированный белок элюировали линейным градиентом концентрации NaCl 0,1 — 0,5 М (2x800 мл) в том же буфере (скорость элюции 60 мл/ч, объем фракций 15 мл). Во фракциях определяли концентрацию белка и активность нуклеозидкиназ.

Фракции, содержащие активность тимидинкиназы, объединяли и пропускали через колонку с голубой сефарозой (1,5x10 см), предварительно уравновешенную 20 мМ Трис-НСl буфером, рН 7,5 с 2 мМ ЭДТА, 1 мМ β-меркаптоэтанолом (буфер А). Адсорбированный белок промывали 40 мл буфера А, и фермент элюировали 10 мМ АТФ в буфере А со скоростью 5 мл/ч (объем фракции 1 мл). Во фракциях определяли активность тимидинкиназы. Фракции с активностью тимидинкиназы объединяли и концентрировали ультрафильтрацией при давлении 3,5 атм./см² до объема 2 мл [6].

Фракции после ионообменной хроматографии, содержащие активность уридинкиназы, объединяли и диализовали в течение ночи против 2 л буфера А. Отдиализованный белковый раствор наносили на колонку с DEAE-toyorearl (1,6x15 см), промывали двумя объемами этого же буфера и элюировали градиентом концентрации 0 — 0,5 М NaCl (2 x 150 мл) в буфере А со скоростью 22 мл/час. Во фракциях объемом 5,0 мл определяли концентрацию белка и активность уридинкиназы.

Активность тимидинкиназы определяли по количеству связавшихся с DEAE-бумагой нуклеотидов, образовавшихся в результате реакции фосфорилирования тимидина. Инкубационная смесь в объеме 50 мкл содержала: 50 мМ трис-НСl, рН 9,0; 1 мМ АТФ; 5 мМ MgCl₂; 1 мкМ NaF; 1 мКи [³H]-тимидина.

После добавления фермента смесь инкубировали 30 мин при 37°C и наносили на фильтры из DEAE-бумаги размером 1x1 см. Фильтры высушивали, промывали последовательно 1 мМ бикарбонатом аммония, водой и этанолом, снова высушивали и определяли радиоактивность в толуольном сцинтилляторе.

Активность уридинкиназы определяли в 50 мкл инкубационной смеси, содержащей 50 мМ трис-НСl, рН 8,0; 1 мМ АТФ; 5 мМ MgCl₂; 1 мкМ NaF; 1 мкКи [³H]-уридина. Далее процедуру определения активности фермента проводили аналогично описанной для тимидинкиназы.

Концентрацию белка определяли по оптическому поглощению при 280 нм и по методу Bradford M.M. [10].

Все эксперименты по исследованию действия биологически активных соединений проводили в 3 повторностях и определяли средние величины и стандартное отклонение. Статистическую обработку проводили с помощью программы MS Excel.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На первом этапе определения биологической активности токсинов *Y. pseudotuberculosis* было исследовано влияние этих белков на оплодотворение яйцеклеток морского ежа спермиями и дальнейшее развитие эмбрионов.

Эмбрионы морских ежей являются удобным объектом при биотестировании различных физиологически активных веществ, в том числе при изучении токсических эффектов различных химических соединений [1]. К достоинствам этой модели относится возможность получения больших партий гамет и синхронно развивающихся эмбрионов, относительная простота инкубации в контролируемых условиях, а также возможность визуального наблюдения эффекта изучаемых веществ в ходе эмбрионального развития. Яйцеклетки морского ежа давно используются для изучения кинетики действия лекарственных препаратов. Спермии иглокожих являются уникальным объектом для определения токсичности различных соединений по их действию на подвижность гамет и их оплодотворяющую способность.

Данные по действию токсических белков *Y. pseudotuberculosis* на спермии морского ежа показали, что в присутствии токсинов оплодотворяющая способность сперматозоидов морского ежа снижалась с увеличением концентрации токсинов от 0,05 до 8 мкг/мл. Для ТЛТ 50% ингибирование оплодотворения (ЛД₅₀) наблюдалось при дозе около 1 мкг/мл, а для ТСТ — при 2 мкг/мл.

Эмбрионы, полученные при оплодотворении яйцеклеток морского ежа спермиями, обработанными токсинами, развивались синхронно с контрольными до стадии 32-64 бластомера (при концентрациях токсинов, соответствующих ЛД₅₀). На дальнейших стадиях развития эмбрионов наблюдали появление уродливых форм эмбрионов. Неоплодотворенные яйцеклетки лизировались. Со временем все большее количество эмбрионов образовывало конгломераты, которые также подвергались лизису и распались на отдельные клетки. До стадии вылупления (9,5 часов) дошла лишь часть эмбрионов. Более 90% в случае ТЛТ и около 80% для ТСТ составляли лизирующиеся агрегаты эмбрионов, а также отдельные клетки, вышедшие через разрушенную оболочку эмбрионов. В контроле с необработанными токсинами спермиями практически 100% эмбрионов достигли стадии вылупления.

Для проведения экспериментов по исследованию действия токсинов на процесс развития эмбрионов *S. intermedius* ТЛТ или ТСТ в диапазоне концентраций от 0,05 до 2 мкг/мл вносили в суспензию оплодотворенных и отмытых от избытка спермы яйцеклеток. Степень оплодотворения составляла 98 — 100%.

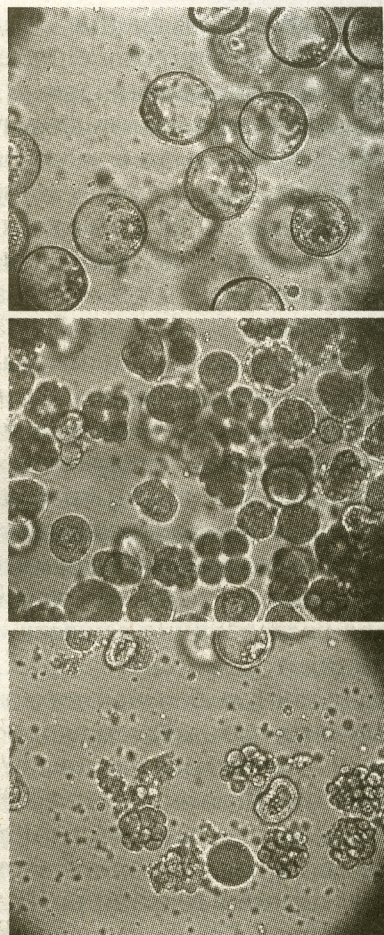
В процессе развития под влиянием токсинов происходило формирование ряда морфологических изменений эмбрионов *S. intermedius*. Их степень зависела как от исследуемого токсина, так и от его концентрации (рис.). Действие термолabileного летального токсина *Y. pseudotuberculosis* при концентрации 0,1 мкг/мл проявлялось только после 4 — 6 часов, до стадии ранней бластулы эмбрионы развивались без отклонений. На стадии средней бластулы 1 обнаруживалось около 10% поврежденных эмбрионов. Через 9,5 часов развития изменениям подверглось уже до 40% эмбрионов. Хотя эмбрионы морского ежа проходили через стадию выщипления, встречались и неподвижные эмбрионы.

Живые нормальные эмбрионы длительное время сохранялись при концентрациях токсина менее 0,2 мкг/мл. Через 2 суток при этих концентрациях выявлены отдельные эмбрионы, достигшие стадии плютеуса. Конгломераты эмбрионов лизировались. Через 72 часа нормальные эмбрионы не обнаруживались, были лишь уродливые формы, в том числе и эмбрионы, остановившиеся на предыдущих стадиях развития.

На стадии поздней гастролы при 1 мкг/мл токсина выявлены лишь единичные живые эмбрионы, около 90% составляли уродливые эмбрионы, распадающиеся агрегаты и отдельные рассыпавшиеся клетки.

В концентрации 1 — 2 мкг/мл ТЛТ (рис.) проявлял свое действие уже на стадии 2 — 4 бластомера. Появлялись единичные эмбрионы с клетками разного размера. На стадии 4 — 8 бластомеров наблюдались уродливые формы эмбрионов (до 15%), у которых клетки отделялись друг от друга, образуя «рыхлую» структуру. Происходила остановка развития некоторых эмбрионов на стадии 2 или 4 бластомеров, и далее они не делились. Останавливалось развитие эмбрионов и на последующих стадиях.

Термостабильный летальный токсин *Y. pseudotuberculosis* действовал на развитие эмбрионов морского ежа на ранних стадиях аналогично действию термолabileного летального токсина (рис.). Это выражалось в остановке развития, начиная со стадии 2 — 4 бластомера, появлении уродливых эмбрионов.



Действие токсинов *Y. pseudotuberculosis* на развитие эмбрионов морского ежа *S. intermedius*. Время инкубации — 16 часов, концентрация токсинов — 2 мкг/мл.

Сверху вниз: контроль без токсина; в присутствии 2 мкг/мл ТЛТ; в присутствии 2 мкг/мл ТСТ.

Однако эти изменения в развитии происходили при более высоких концентрациях ТСТ по сравнению с ТЛТ. При 0,05 мкг/мл ТСТ эмбрионы развивались так же, как и контрольные образцы до стадии вылупления (9,5 часов). Этот токсин не вызывал видимого воздействия на эмбрионы в концентрациях менее 0,5 мкг/мл до 6 часов развития. Образование конгломератов эмбрионов началось после стадии вылупления. На стадии средней гаструлы появились уродливые эмбрионы с кишкой, выпяченной наружу. Клетки сохранившихся эмбрионов продолжали делиться и проходили стадии развития, соответствующие контрольным эмбрионам без токсинов. Часть эмбрионов, развивающихся при концентрациях белка 0,2 мкг/мл и менее, достигали стадии плютеуса, и даже через 72 ч наблюдались живые эмбрионы. Уродливые эмбрионы и агрегаты подвергались полному лизису.

Для поиска мишени действия биологически активных соединений в первую очередь исследуют их влияние на скорость синтеза таких важнейших клеточных биополимеров, как ДНК, РНК и белок. На ранних этапах развития эмбрионов морского ежа в их клетках происходит интенсивный синтез нуклеиновых кислот. Биосинтез ДНК в эмбрионах является в основном, репликативным, что делает развивающиеся эмбрионы привлекательной моделью для исследования веществ, влияющих на этот процесс [11]. Специфическим индикатором синтеза ДНК, а также клеточного роста считается включение радиоактивно меченного тимидина. Включение меченого уридина может служить показателем скорости синтеза РНК.

Нами было исследовано влияние токсических белков *Y. pseudotuberculosis* ТЛТ и ТСТ на включение [³H]-тимидина и [³H]-уридина в состав нуклеиновых кислот развивающихся эмбрионов морского ежа, а также на биосинтез белка в эмбриональных клетках, определяемый по включению радиоактивно меченных аланина и лейцина.

Через 4 часа инкубации эмбрионов морского ежа с ТЛТ наблюдалось снижение уровня включения экзогенного тимидина в клетки эмбрионов на 35 — 45% по сравнению с контролем без токсина, начиная с дозы 1 мкг. Небольшое ингибирование синтеза ДНК токсином сохранялось и через сутки развития эмбрионов. Ингибирующий эффект ТЛТ наблюдался также при исследовании включения экзогенного уридина клетками эмбрионов *S. intermedius*, особенно через 24 часа инкубации, когда уровень включения меченого уридина многократно увеличился. Ингибирование при 1 мкг/мл составило 40%, а при 2 мкг/мл ТЛТ — около 70%.

ТСТ *Y. pseudotuberculosis* не влиял на включение радиоактивно меченных тимидина и уридина в нуклеиновые кислоты развивающихся эмбрионов морского ежа в интервале концентрации от 10 до 200 мкг/мл, но ингибировал биосинтез белка в эмбриональных клетках [9]. При концентрации токсина 10 мкг/мл ингибирование включения лейцина составило 20%, а при 50 мкг/мл ТСТ эффективность включения меченых аминокислот снижалась на ~70%. Высокие концентрации этого токсина, необходимые для ингибирования белкового синтеза, возможно, обусловлены скоростью проникновения его в клетки эмбрионов. На ранних стадиях развития эмбрионы морского ежа окружены оболочкой оплодотворения, и она может являться природным барьером для проникновения в клетку.

Термолабильный летальный токсин *Y. pseudotuberculosis* практически не затрагивал белковый синтез в клетках эмбрионов. В течение 5 часов инкубации

присутствие ТЛТ не снижало уровня включения меченых аланина и глицина [7].

Определение скорости включения экзогенных меченых предшественников — широко используемый метод для изучения синтеза биополимеров в клетках и влияния на эти процессы различных биологически активных соединений. На первых этапах эмбрионального развития у морского ежа происходит очень интенсивный синтез ДНК, необходимый для быстрого деления клеток. Клетки дробятся, не успевая увеличиваться в размерах. Увеличение уровня включения уридина через сутки свидетельствует о протекании интенсивных метаболических процессов, связанных с биосинтезом РНК. Ингибирование включения радиоактивно меченных тимидина и уридина может свидетельствовать о влиянии токсина на биосинтез ДНК и РНК. Однако меченые нуклеозиды претерпевают внутри клетки сложные метаболические превращения, и это не дает возможности конкретизировать мишень действия токсина. Ингибирующее действие может быть обусловлено, в частности, влиянием токсина на ферменты полимеризации ДНК или РНК, на биосинтез предшественников и т. д. Для выяснения механизма действия токсинов необходимы эксперименты с индивидуальными ферментами.

Для включения в состав нуклеиновых кислот экзогенные рибо- и дезоксирибонуклеозиды должны транспортироваться через клеточные мембраны и фосфорилироваться в клетке до нуклеозидтрифосфатов, являющихся непосредственными субстратами для РНК- или ДНК-полимеризующих ферментов. Ключевую роль в этом процессе играют нуклеозидкиназы, катализирующие первую ступень фосфорилирования нуклеозидов до их монофосфатов. Активность тимидинкиназы, отвечающей за фосфорилирование тимидина, обнаружена в подавляющем большинстве исследованных организмов, включая вирусы, бактерии, клетки растений и животных [15]. Активность этого фермента, как правило, коррелирует со скоростью синтеза ДНК и высока в быстро делящихся клетках. В то же время, данных о рибонуклеозидкиназах в настоящее время недостаточно.

Следующим этапом работы стало выяснение действия токсинов *Y. pseudotuberculosis* на активность нуклеозидкиназ морского ежа. Ранее из яйцеклеток морского ежа была очищена тимидинкиназа и исследованы ее свойства [6]. Для проведения экспериментов с токсинами *Y. pseudotuberculosis* нами была выделена уридинкиназа из яйцеклеток морского ежа.

Термолабильный летальный токсин *Y. pseudotuberculosis* оказывал некоторый ингибирующий эффект на активность нуклеозидкиназ морского ежа, катализирующих фосфорилирование тимидина и уридина. Однако даже при очень высоких концентрациях ТЛТ (20 — 50 мкг/мл) ингибирование не достигало 50%. Причем, степень ингибирования практически была одинаковой как для уридинкиназы, так и для тимидинкиназы. В то же время, ингибирование биосинтеза нуклеиновых кислот, определяемое по включению тимидина и уридина, наблюдалось уже при концентрациях токсина 1 — 2 мкг/мл. Биосинтез ДНК снижался на ~40%, а ингибирование биосинтеза РНК составило около 70%. Можно предположить, что наблюдаемое ингибирование ферментов биосинтеза предшественников ТЛТ *Y. pseudotuberculosis* носит неспецифический характер.

Термостабильный летальный токсин *Y. pseudotuberculosis* не влиял на активность тимидин- и уридинкиназ даже в концентрации 100 мкг/мл. Этот факт

согласуется с отсутствием влияния этого токсина на включение радиоактивно меченных тимидина и уридина в нуклеиновые кислоты развивающихся эмбрионов морского ежа, а также изолированных из клеток эмбрионов морского ежа ядер [9].

Представленная работа посвящена изучению биологической активности двух белковых токсинов — термолabileного и термостабильного летальных токсинов *Y. pseudotuberculosis*. В качестве модельной системы использованы гаметы и развивающиеся эмбрионы морского ежа *S. intermedius*. Преимуществом этого объекта является возможность изучения действия токсинов на уровне целых клеток, на процессы биосинтеза важнейших биополимеров клетки — белка и нуклеиновых кислот, а также на активность некоторых ферментов, вовлеченных в эти процессы.

Оба исследуемых токсина *Y. pseudotuberculosis* обладали спермиотоксичным действием, причем токсичность ТЛТ в отношении спермиев морского ежа в два раза превышала токсичность ТСТ, а ЛД₅₀ составила соответственно 1 и 2 мкг/мл. Действие токсинов *Y. pseudotuberculosis* на развивающиеся эмбрионы морского ежа проявлялось в изменениях их морфологии, остановке развития некоторых эмбрионов на ранних этапах эмбриогенеза, разрушении клеток и гибели эмбрионов. При этом повреждающее действие ТЛТ наблюдалось при более низких его концентрациях по сравнению с ТСТ.

Исследование влияния токсинов на включение предшественников биосинтеза белка, ДНК и РНК выявило различие механизмов их действия на эти процессы. Термолabileный летальный токсин практически не затрагивал белковый синтез в клетках эмбрионов. Синтез ДНК и РНК, определяемый по включению экзогенных [³H]тимидина и [³H]уридина клетками эмбрионов морского ежа, этот токсин ингибировал уже при концентрации 1 — 2 мкг/мл. Кроме того, ТЛТ оказывал ингибирующее действие и на активность выделенных из яйцеклеток морского ежа тимидинкиназы и уридинкиназы.

В противоположность этому, ТСТ ингибировал биосинтез белка в эмбрионах морского ежа, но не влиял на биосинтез нуклеиновых кислот даже в высоких концентрациях. Этот белок не оказывал действия на активность нуклеозидкиназ морского ежа.

Таким образом, оба белковых токсина *Y. pseudotuberculosis* влияют на развитие эмбрионов морского ежа *S. intermedius*, однако механизмы воздействия ТЛТ и ТСТ на эмбрионы морского ежа и протекающие в них процессы различаются. Очевидно, мишени действия токсинов в эукариотических клетках различны.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бузников Г.А., Подмарев В.И. Морские ежи *Strongylocentrotus drobachiensis*, *S. nudus*, *S. intermedius*. Объекты биологии развития. М., Наука, 1975.
2. Кузнецов В.Г., Лаженцева Л.Ю., Елисейкина М.Г., Шульгина Л.В., Тимченко Н.Ф. Распространение бактерий рода *Yersinia* в морской воде и гидробионтах. Журн. микробиол. 2006, 3: 117-120.
3. Недашковская Е.П., Тимченко Н.Ф., Беседнов А.Л., Вертиев Ю.В. Термостабильный токсин *Yersinia pseudotuberculosis*. Журн. микробиол. 2006, 4: 5-9.
4. Персиянова Е.В., Адамов Р.Р., Сурин А.К., Псарева Е.К., Ермолаева С.А., Тимченко Н.Ф. Цитотоксический некротизирующий фактор *Yersinia pseudotuberculosis*, возбудителя Дальневосточной скарлатиноподобной лихорадки. Бюлл. СО РАМН. 2013, 33 (2): 16-20.

5. Покровский В.К., Тимченко Н.Ф., Недашковская Е.П., Григорьева Г.А. Термолabileный летальный токсин *Yersinia pseudotuberculosis*. Журн. микробиол. 2008, 6: 63-66.
6. Терентьев Л.Л., Терентьева Н.А., Захарова Л.А., Рассказов В.А. Тимидинкиназа из яйцеклеток морского ежа. Биохимия. 1990, 55 (В. 12): 2293-2299.
7. Терентьева Н.А., Тимченко Н.Ф., Персиянова Е.В., Рассказов В.А. Действие термолabileного летального токсина *Yersinia pseudotuberculosis* на эмбриогенез и биосинтез ДНК, РНК и белка в эмбрионах морского ежа *Strongylocentrotus intermedius*. Тихоокеанский медицинский журнал. 2010, 3: 81-84.
8. Тимченко Н.Ф., Недашковская Е.П., Долматова Л.С., Сомова-Исачкова Л.М. Токсины *Yersinia pseudotuberculosis*. Владивосток, 2004.
9. Тимченко Н.Ф., Терентьев Л.Л., Недашковская Е.П., Разник Н.В., Рассказов В.А. Действие термостабильного токсина *Yersinia pseudotuberculosis* на биосинтез ДНК, РНК и белка в эукариотических клетках. Эпидемиология и инфекционные болезни. 2002, 1: 22-25.
10. Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye-binding. Anal. Biochem. 1976, 72: 248-254.
11. Kukhanova M., Kravetsky A., Terentyeva N. et al. Inhibition of replicative DNA synthesis in nuclei of *Strongylocentrotus intermedius* urchin embryos by 2',3'-dideoxy-3'-aminonucleoside-5'-triphosphates. Biochim. Biophys. Acta. 1984, 783: 221-226.
12. Lockmann H.A., Gillespie R.A., Baker B.D. et al. *Yersinia pseudotuberculosis* produces a cytotoxic necrotizing factor. Inf. Immun. 2002, 70 (5): 2708-2714.
13. Pha K., Navarro L. *Yersinia* type III effectors perturb host innate immune responses. World J. Biol. Chem. 2016, 7 (1): 1-13.
14. Timchenko N.F., Adgamov R.R., Ermolaeva S.A. Variability in the functional domains of the Rho-modifying toxins of *Yersinia pseudotuberculosis*. Adv. Exp. Med. Biol. 2010, 954: 261-266.
15. Van Rompay A.R., Johansson M., Karlsson A. Substrate specificity and phosphorylation of antiviral and anticancer nucleoside analogues by human deoxyribonucleoside kinases and ribonucleoside kinases. Pharmacol. Ther. 2003, 100 (2): 119-139.

Поступила 01.06.16

Контактная информация: Терентьева Наталья Александровна, к.б.н.,
690022, Владивосток, пр. 100 лет Владивостоку, 159, р.т. 8(423)231-07-03

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2016

*Д.А.Левченко, В.Д.Кругликов, А.С.Водопьянов, С.В.Титова,
И.В.Архангельская, Н.Б.Непомнящая, М.И.Ежова*

ГИС: ВОЗМОЖНОСТИ АНАЛИЗА ДАННЫХ ФЕНО- И ГЕНОТИПИРОВАНИЯ ХОЛЕРНЫХ ВИБРИОНОВ O1 СЕРОГРУППЫ ЭЛЬ ТОР, ИЗОЛИРОВАННЫХ ИЗ ВОДНЫХ ОБЪЕКТОВ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ НА ТЕРРИТОРИИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

Ростовский-на-Дону противочумный институт

Цель. Применение авторской ГИС «Холера 1989-2014» для систематизации атоксигенных штаммов холерных вибрионов O1 серогруппы (stxAB-tcpA-, stxAB-tcpA+), выделенных из водных объектов окружающей среды, по фено- и генотипу. *Материалы и методы.* Изучена выборка из 304 штаммов *Vibrio cholerae* O1. Проведено выявление 39 генов, связанных с патогенностью. Дискриминационную способность набора генов определяли по формуле Симпсона. Кластерный анализ проводили по методу UPGMA. *Результаты.* С помощью ГИС был проведен анализ многолетних данных о циркуляции водных штаммов *V. cholerae* O1 на территории субъектов страны. Показана возможность систематизации фенотипов изолированных штаммов по заданным параметрам. Разработана экспериментальная программа для выявления наличия/отсутствия различных генов и их комбинаций для генотипирования. *Заключение.* Установлено, что ГИС позволяет проводить анализ фенотипов по заданным параметрам, а также осуществлять ориентировочную