

А.А.Бывалов², А.В.Чернядьев¹, И.В.Маракулин¹, К.Е.Гаврилов¹

ВЛИЯНИЕ НОСИТЕЛЬСТВА FRA-ОПЕРОНА *YERSINIA PESTIS* НА МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ КЛЕТОК РЕЦИПИЕНТНОГО ШТАММА *YERSINIA PSEUDOTUBERCULOSIS*

¹ФГУ «48 ЦНИИ Минобороны РФ», Киров; ²Институт физиологии Коми Научного Центра Уральского Отделения Российской Академии Наук, Сыктывкар

Оценена зависимость морфологических свойств микробов *Yersinia pseudotuberculosis* 164/84 от температуры культивирования и носительства fra-оперона чумного микроба. При температуре выращивания 4–6 °С бактерий двух изогенных вариантов (fra⁺ и fra⁻) штамма 164/84 отмечается меньшая, по сравнению с температурой 26–28 и 36–38 °С, скорость развития популяции. Существенные различия между микробами fra⁺- и fra⁻ вариантов проявляются лишь на поздних сроках выращивания культур при температуре 36–38 °С и заключаются в относительно больших размерах клеток капсулообразующего варианта.

Ключевые слова: *Yersinia pseudotuberculosis*, микробная культура, fra-оперон, антиген FI, fra⁺- и fra⁻- изогенные варианты.

Капсула (или капсулоподобные образования) является одним из факторов патогенности бактерий многих таксонов, вызывающих антропонозные заболевания. К числу таких микробов относится и возбудитель чумы, способный образовывать капсулу, участвующую в проявлении антифагоцитарной, адгезивной активностей микроба в организме теплокровного хозяина [1]. Иммунохимическая активность капсулы определяется антигеном FI, продукция которого усиливается при повышении температуры культивирования чумного микроба. Капсульный антиген FI широко используется в производстве и разработке иммунопрофилактических, иммунодиагностических препаратов. В качестве штаммов – продуцентов FI-антигена в таких работах обычно используют вакцинный штамм EV чумного микроба либо рекомбинантные варианты грамотрицательных бактерий, в геном клеток которых включен fra-оперон *Yersinia pestis*. Такие варианты могут применяться при изучении механизмов патогенеза чумы, формирования специфического иммунитета, а также филогенеза *Y. pestis*. В настоящее время считается общепризнанной теория о происхождении чумного микроба от возбудителя туберкулеза. Одним из крупных эволюционных шагов этого процесса явилось приобретение клетками «прародителя» *Y. pestis* плазмиды, детерминирующей в том числе биосинтез FI-антигена и обусловившей существенный вклад в процесс перехода одной из ветвей иерсиний от сапрофитизма к паразитизму.

Ранее нами получены два изогенных варианта иерсиний, с помощью которых мы начали исследования условий экспрессии и структурно-функциональной значимости признака капсулообразования *Y. pestis* в бактериях близкородственного реципиента – *Yersinia pseudotuberculosis* [2, 3].

Целью настоящей работы являлось изучение

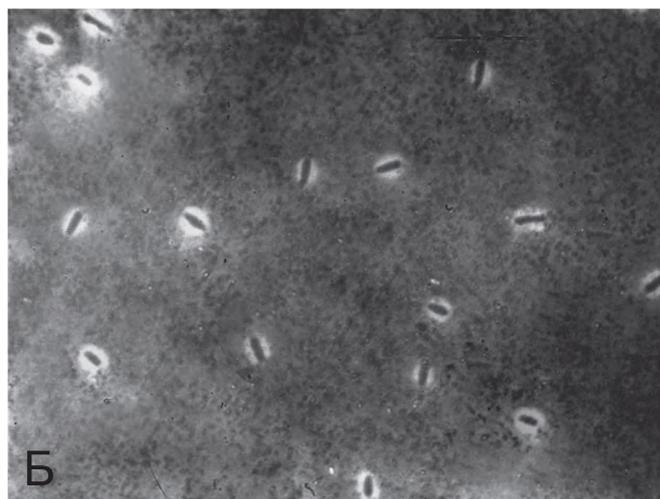
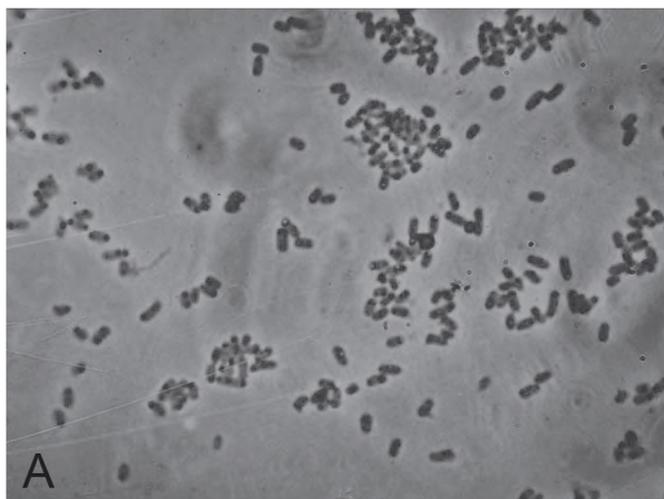
по морфометрическим показателям экспрессии fra-оперона *Y. pestis* в клетках *Y. pseudotuberculosis* при различных температурных условиях культивирования.

Материалы и методы

В работе использовали два изогенных варианта *Y. pseudotuberculosis*, полученных путем трансформации в клетки реципиентного штамма 164/84, плазмид pBR328-Fra и pBR328, различающихся лишь наличием или отсутствием fra-оперона чумного микроба и поименованных далее *Y. pseudotuberculosis* 164/84 (pBR328-Fra) и *Y. pseudotuberculosis* 164/84 (pBR328) (или fra⁺- и fra⁻- варианты) соответственно [2]. Культуры двух названных вариантов *Y. pseudotuberculosis* выращивали на агаре Хоттингера (pH 7,2) при температуре 4–6, 26–28 и 36–38 °С в течение 5 сут. Культуры для исследования смывали с поверхности среды 0,9 % раствором NaCl.

Иммунохимическую активность культур оценивали в реакции диффузионной преципитации (РДП) с антисывороткой к FI-антигену и в реакции непрямой гемагглютинации (РНГА) с эритроцитарным чумным иммуноглобулиновым диагностикомом производства 48 ЦНИИ Минобороны России. Наличие или отсутствие капсулы у бактерий изучаемых вариантов оценивали микроскопическим методом тушевого контрастирования.

Морфологические свойства микробов анализировали при помощи циторефрактометрического метода и автоматизированной морфометрии. Циторефрактометрический метод использовали для определения относительного содержания в пробах живых и делящихся клеток. Препараты для аноптальной микроскопии готовили по известной методике [5] и анализировали с помощью микроскопа МБИ-15. Для автоматизированного измерения геометрических ха-



Микроскопия методом тушевого контрастирования бактерий *Y. pseudotuberculosis* 164/84 (pBR328) (А) и 164/84 (pBR328-Fra) (Б), выращенных при температуре 36–38 °С

рактических микробов использовали анализатор изображений «MAGISCAN 2» фирмы «JOYCE-LOEBL», Англия. Коэффициент формы эллипсоидных клеток определяли принятым методом [4].

Результаты и обсуждение

Результаты микроскопических исследований методом тушевого контрастирования показали, что вокруг бактерий 164/84 (pBR328-Fra), выращенных при температуре 26–28 °С и (в большей степени) 36–38 °С, выявляется капсула. На рисунке видно, что клетки капсулообразующего варианта (Б) окружены зоной просветления, отсутствующей у контрольного варианта 164/84 (pBR328) (А). При температуре выращивания микробов 164/84 (pBR328-Fra), равной 4–6 °С, капсула не выявлялась.

Результаты определения иммунохимической активности культур двух сравниваемых вариантов псевдотуберкулезного микроба, представленные в табл. 1, показывают, что fra-оперон *Y. pestis* в составе гибридной плазмиды pBR328-Fra индуцирует биосинтез FI-антигена и в клетках нового хозяина: культуры референс-варианта (fra-варианта) FI-антиген не продуцировали (данные не представлены). Следует отметить, что выраженность этого призна-

ка, как и в чумных бактериях, зависит от температуры выращивания биомассы клеток: максимальная продукция FI-антигена отмечена при температуре культивирования 36–38 °С, существенно меньшая при температуре 26–28 °С; при 4–6 °С РДП и РНГА не выявляли в культуре fra⁺-варианта FI-антиген при использованных условиях их постановки.

Интенсивное шуттелирование культуры fra⁺-варианта, выращенной при температуре 36–38 °С, и последующее ее центрифугирование (10000 g, 30 мин) приводило к «вымыванию» капсулообразного вещества с поверхности клеток, о чем судили по данным микроскопии (метод тушевого контрастирования) клеток до и после указанных операций, а также по результатам РДП и РНГА препаратов надосадочной жидкости и клеточных осадков, полученных после центрифугирования шуттелированной и нешуттелированной культур.

При высеве на плотную питательную среду микробы двух вариантов *Y. pseudotuberculosis* приживались и начинали активно расти, скорость роста зависела от температуры выращивания.

Наибольшая скорость роста популяции наблюдалось при температуре 26–28 °С, при которой культуры обычно уже на 2-е – 3-и сутки выходили на стационарную или близкую к ней фазу. Об этом свидетельствуют невысокое содержание делящихся клеток, их размеры и форма, а также относительная однородность культур и высокое значение отношения площади поверхности к объему микробов (табл. 2). При дальнейшем выращивании изменения в культурах продолжались в сторону снижения размеров клеток и содержания делящихся особей, а также резкого уменьшения содержания живых бактерий, что указывает на отмирание большей части популяции уже на 5-е сутки культивирования (табл. 2).

При температуре выращивания 4–6 °С все мета-

Таблица 1

Иммунохимическая активность культур *Y. pseudotuberculosis* 164/84 (pBR328-Fra), выращенных при различных температурах

Метод определения	Титр FI-антигена в культурах, выращенных при температуре ... °С		
	4–6	26–28	36–38
РДП	Нет	1:16	1:128
РНГА	Нет	1:64	1:512

Примечание. Исследуемые культуры, выращенные в течение 5 сут, начинали титровать (с шагом 2): для РДП с концентрации 10¹¹ м.к.·см⁻³, для РНГА – с 10⁷ м.к.·см⁻³.

Динамика морфометрических параметров бактерий *Y. pseudotuberculosis* штамма 164/84 при выращивании на плотной питательной среде, ($\bar{x} \pm J_{95}$)

Температура выращивания, °С	Вариант штамма	Время выращивания, сут	Содержание живых клеток, %	Содержание делящихся клеток, %	Длина клеток, мкм	Диаметр клеток, мкм	Коэффициент формы клеток, отн. ед.	Отношение площади к объему клеток, мкм ⁻¹
4–6	fra ⁻	1	91,5 ± 1,6	40,0 ± 3,6	3,07 ± 0,26	0,92 ± 0,05	0,91 ± 0,02	4,84 ± 0,22
		3	93,8 ± 1,3	15,1 ± 3,0	2,72 ± 0,23	0,91 ± 0,05	0,89 ± 0,02	4,95 ± 0,19
		5	96,8 ± 1,0	10,8 ± 1,9	2,34 ± 0,16	0,83 ± 0,04	0,87 ± 0,02	5,47 ± 0,18
	fra ⁺	1	93,6 ± 1,4	43,5 ± 3,9	3,25 ± 0,29	0,92 ± 0,05	0,92 ± 0,03	4,76 ± 0,25
		3	94,0 ± 1,4	19,9 ± 2,2	2,56 ± 0,25	0,91 ± 0,05	0,89 ± 0,02	4,90 ± 0,20
		5	98,5 ± 0,7	14,8 ± 2,8	2,26 ± 0,17	0,77 ± 0,03	0,88 ± 0,02	5,87 ± 0,19
26–28	fra ⁻	1	99,0 ± 0,6	11,8 ± 1,7	1,54 ± 0,11	0,82 ± 0,04	0,72 ± 0,02	5,92 ± 0,14
		3	78,0 ± 2,1	5,4 ± 1,2	1,41 ± 0,10	0,72 ± 0,04	0,74 ± 0,02	6,71 ± 0,12
		5	18,9 ± 2,0	3,0 ± 1,0	1,32 ± 0,10	0,70 ± 0,03	0,72 ± 0,01	6,95 ± 0,12
	fra ⁺	1	98,1 ± 0,7	12,4 ± 1,8	1,51 ± 0,12	0,76 ± 0,03	0,75 ± 0,02	6,29 ± 0,15
		3	62,0 ± 2,3	5,8 ± 1,3	1,52 ± 0,11	0,75 ± 0,03	0,76 ± 0,02	6,40 ± 0,11
		5	17,8 ± 1,8	3,5 ± 1,0	1,38 ± 0,10	0,69 ± 0,03	0,75 ± 0,02	6,99 ± 0,12
36–38	fra ⁻	1	90,2 ± 1,5	12,6 ± 1,7	1,63 ± 0,13	0,93 ± 0,05	0,68 ± 0,02	5,30 ± 0,16
		3	69,3 ± 2,2	10,5 ± 1,6	1,75 ± 0,13	0,99 ± 0,05	0,69 ± 0,02	4,99 ± 0,17
		5	51,8 ± 2,3	4,6 ± 1,2	1,70 ± 0,12	0,94 ± 0,04	0,69 ± 0,02	5,23 ± 0,16
	fra ⁺	1	87,8 ± 2,0	15,2 ± 3,0	1,78 ± 0,13	0,92 ± 0,04	0,73 ± 0,03	5,23 ± 0,15
		3	65,3 ± 2,3	10,8 ± 2,0	1,87 ± 0,14	0,97 ± 0,05	0,73 ± 0,02	4,99 ± 0,16
		5	56,1 ± 2,2	7,4 ± 1,6	1,96 ± 0,13	1,06 ± 0,05	0,71 ± 0,02	4,61 ± 0,17

болические процессы в популяции *Y. pseudotuberculosis*, по-видимому, протекают значительно медленнее. Низкие скорости подготовки к делению и самого деления, а также отмирания и лизиса клеток находят отражение в высоком содержании живых и делящихся микробов, больших размерах бактерий и выраженном полиморфизме культур. Даже к 5-м суткам культивирования при температуре 4–6 °С популяции далеки от стационарной фазы.

Для культур *Y. pseudotuberculosis*, выращенных при температуре 36–38 °С, уже в начальный период развития популяции отмечено значительное содержание отмирающих клеток на различных стадиях этого процесса. В таких культурах наблюдалось и много морфологически измененных микробов – раздутых, округлых, иногда шаровидных. В связи с наличием большого разнообразия форм клеток культуры выглядели очень полиморфными (хотя средние размеры клеток варьируют мало). При выращивании культуры в течение более 3 сут процессы отмирания клеток продолжали нарастать, а доля делящихся бактерий снижалась.

По морфологическим параметрам различия бактерий fra⁺- и fra⁻- вариантов штамма 164/84 псевдотуберкулезного микроба выражены слабо, существенных отличий между культурами двух вариантов, выращенными при температуре 4–6 °С и 26–28 °С, ни по одному из оцениваемых показателей не отмечено. Однако анализ динамики развития культур при температуре 36–38 °С выявил, что культуры fra⁺- и fra⁻- вариантов после 3 сут культивирования

резко расходятся по размерам клеток – их длине и диаметру (табл. 2). По другим морфологическим показателям культуры так выражено не отличались. По-видимому, такие различия между двумя вариантами микробов обусловлены относительным повышением биосинтеза и/или экскреции FI-антигена к 5-м суткам выращивания бактериями fra⁺-варианта с усилением процесса капсулообразования и соответствующим увеличением размеров клеток. Отличия в развитии штаммов подтверждаются и тем, что для fra⁺-варианта с 3-х по 5-е сутки выращивания убыль относительного содержания живых клеток составила 9,2 %, а делящихся – 3,4 %, в то время как значения указанных показателей для fra⁻-варианта составили 17,5 и 5,9 % соответственно, т.е. различались почти в 2 раза. Кроме того, только у fra⁺-варианта при температуре выращивания 36–38 °С на 5-е сутки роста отмечено снижение отношения площади поверхности клеток к их объему (табл. 2), что обычно наблюдается при стабильных условиях развития популяции.

Таким образом, установлено, что микробы рекомбинантного варианта *Y. pseudotuberculosis* 164/84, включающие fra-оперон *Y. pestis* и выращенные на плотной питательной среде при температуре 36–38 °С, образуют капсулу (капсулоподобное вещество), непрочно связанную с клеточной поверхностью. Показано также увеличение средних размеров (длины и диаметра) клеток названного варианта, в отличие от его изогенного fra⁻-варианта, на 5-е сутки культивирования при температуре 36–38 °С. При использовании иных температурных режимов выращи-

вания – 4–6 °С и 26–28 °С – значимых морфометрических различий между культурами сравниваемых вариантов не выявлено.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Анисимов А.П. Факторы *Yersinia pestis*, обеспечивающие циркуляцию и сохранение возбудителя чумы в экосистемах природных очагов. Сообщение I. Мол. генет., микробиол. и вирусол. 2002; 3:3–23.
2. Бавалов А.А., Гаврилов К.Е., Крутин В.В. и др. Биологические и физико-химические свойства культур бактерий *Yersinia pseudotuberculosis*, несущих fra-оперон *Yersinia pestis*. Мол. генет., микробиол. и вирусол. 2008; 1:14–8.
3. Печенкин Д.В., Бывалов А.А., Маракулин И.В. Влияние капсулы *Yersinia pestis* на фагоцитарную активность перитонеальных макрофагов морской свинки. Пробл. особо опасных инф. 2005; 90(2):47–8.
4. Тумаков В.Д., Гольдфраб Д.М. Основы экспериментальной медицинской бактериологии. М.: Медгиз; 1958. 347 с.
5. Фихман Б.А. Микробиологическая рефрактометрия. – М.: Медицина; 1967. 325 с.

УДК 616.981.452+616-002.71

Н.А.Видяева, А.В.Гаева, Л.М.Куклева, Г.Н.Одиноков, В.В.Кутырев

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА АНТИОКИСЛИТЕЛЬНЫХ ФЕРМЕНТОВ ШТАММОВ *YERSINIA PESTIS* РАЗЛИЧНЫХ ПОДВИДОВ И *YERSINIA PSEUDOTUBERCULOSIS*

ФГУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов

Проведено сравнительное электрофоретическое изучение антиокислительных ферментов (супероксиддисмутаза, каталаза и пероксидаза) у штаммов *Yersinia pestis*, *Yersinia pseudotuberculosis*, *Escherichia coli* и *Salmonella typhimurium*. Показано, что антиокислительные ферменты иерсиний по электрофоретической подвижности отличаются от ферментов *E. coli* и *S. typhimurium*. Их экспрессия зависит от температуры культивирования и плазмидного состава. Выявлены особенности экспрессии каталазы-пероксидазы у штаммов возбудителя чумы улэгейского подвида, у штаммов возбудителя псевдотуберкулеза VI серовара и штаммов, выделенных от людей.

Ключевые слова: *Yersinia pestis*, *Yersinia pseudotuberculosis*, антиокислительные ферменты, супероксиддисмутаза, каталаза, пероксидаза.

Возбудитель чумы, *Yersinia pestis*, в отличие от своего предшественника возбудителя псевдотуберкулеза, *Yersinia pseudotuberculosis*, является факультативным внутриклеточным паразитом. Попадая в фагоцит, чумной микроб подвергается антимикробному действию факторов защиты фагоцитирующей клетки, проявлением одного из которых является «окислительный взрыв». При этом в фагоците образуются активные формы кислорода: супероксиданион, гидроперекиси, гидроксильный радикал, действие которых направлено на повреждение жирных кислот, белков, ДНК [9, 17, 20]. Патогенные микроорганизмы выработали ряд механизмов, направленных на защиту клетки от окислительного повреждения, среди которых важная роль принадлежит антиокислительным ферментам (АО) – супероксиддисмутазе (СОД) и гидропероксидазам (каталазе и пероксидазе) [5]. У целого ряда патогенных бактерий обнаружена корреляция между активностью АО ферментов, устойчивостью к фагоцитозу и вирулентностью [6, 18].

У возбудителя чумы выявлены и охарактеризованы супероксиддисмутаза, каталаза и пероксидаза [1, 2, 15, 19, 21]. Установлено, что супероксиддис-

A.A.Byvalov, A.V.Chemyadiev, I.V.Marakulin, K.E.Gavrilov

Effects of *Yersinia pestis* Fra-Operon Carriage on the Cellular Morphologic Features of the Recipient *Yersinia pseudotuberculosis* Strain

The 48th Central Scientific Research Institute of the RF Ministry of Defense, Kirov; Physiology Institute of Komi Scientific Center of the Urals Division of the Russian Academy of Sciences, Syktyvkar

Cellular morphologic variations of *Yersinia pseudotuberculosis* strain 164/84 were assessed depending on the cultivation temperature and the plague agent's fra-operon carriage by these cells. Notably slower population growth of the two isogenic variants of strain 164/84 (fra⁺ and fra⁻) was observed at the cultivation temperatures of 4 to 6 °C as compared with those at 26–28 °C and 36–38 °C. Only late growth stages at the temperatures of 36 to 38 °C brought about significant differences between the fra⁺ and fra⁻ cell variants expressed in the occurrence of relatively bigger cells in the population of the capsule forming *Y. pseudotuberculosis* variant.

Key words: *Yersinia pseudotuberculosis*, microbial culture, fra-operon, F1-antigen, fra⁺ and fra⁻ isogenic variants.

Поступила 07.12.07.

мутазная и каталазная активности являются термоиндуцибельными признаками [2, 4, 19, 21] и активность супероксиддисмутазы не связана с носительством собственных плазмид. В 1993 г. R.J.Mehigh и R.R.Brubaker [21] идентифицировали белок с молекулярной массой ~70 кД (p70), как каталазу, но не пероксидазу и супероксиддисмутазу. Этот белок экспрессировался в Ca²⁺-дефицитной среде только при 37 °C, и его каталазная активность составляла менее 10 % от общей каталазной активности в клеточных экстрактах. Они также определили, что белок p70 является одним из термоиндуцибельных антигенов возбудителя чумы, названного антиген 5 или E, так как этот белок перекрестно реагировал с антителами, полученными к антигену 5. M.Rockenmacher [23] обнаружил корреляцию между высокой каталазной активностью и вирулентностью *Y. pestis*, по мнению других авторов такой корреляции не наблюдается. Кроме того, было выявлено, что активность и каталазы, и пероксидазы возбудителя чумы и псевдотуберкулеза несколько различались между собой [1, 10].

На территории бывшего СССР и Монголии, помимо основного подвида возбудителя чумы, цир-