

DOI: 10.21055/0370-1069-2024-3-81-87

УДК 616.98:579.842.23

А.Ю. Гончарова, С.А. Бугоркова, А.С. Абдрашитова, Н.Е. Щербакова, Я.М. Краснов,
В.Г. Германчук, З.Л. Девдариани, И.Г. Швиденко, Т.Н. Щуковская

Влияние азоксимера бромида при добавлении в среду культивирования *Yersinia pestis* EV НИИЭГ на отдельные геномные и протеомные характеристики штамма

ФКУН «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов, Российская Федерация

Цель исследования – изучение влияния иммуноадьюванта азоксимера бромида (полиоксидоний, ПО) при добавлении его в среду культивирования на отдельные молекулярно-генетические и протеомные особенности штамма *Yersinia pestis* EV НИИЭГ. **Материалы и методы.** *Y. pestis* EV НИИЭГ выращивали при 28 °C в течение 48 ч на агаре LB, pH 7,2 (Miller), как с ПО (EV+ПО), так и без (EV). Полногеномное секвенирование штаммов EV и EV+ПО проводили на платформе II поколения Ion S5 XG. Полногеномный SNP-анализ и поиск маркерных SNPs осуществляли в программе Wombac 2.0. Снятие масс-спектров экстрактов клеток *Y. pestis* EV и EV+ПО проводили на масс-спектрометре Microflex LT. Протективные свойства тестируемых культур оценивали по интегральному показателю ImD₅₀ на мышах BALB/c при заражении *Y. pestis* 231(708). **Результаты и обсуждение.** При сравнительном анализе в структуре генома штаммов *Y. pestis* EV+ПО делеций, инсерций и единичных нуклеотидных замен, приводящих к нарушению продукции факторов патогенности, иммуногенности и обеспечения жизнедеятельности возбудителя чумы, не обнаружено. Методом MALDI-TOF масс-спектрометрии установлено, что у штаммов *Y. pestis* EV+ПО изменяется интенсивность 22 % от общего количества пиков в диапазоне 2000–20000 Да. Основная часть измененных пиков относится по банку белков UniProtKB к не охарактеризованным протеинам и метаболическим белкам. При этом у культур, выращенных с добавлением ПО, ImD₅₀ в 2–3,3 раза ниже, чем у *Y. pestis* EV. Таким образом, добавление ПО в среду культивирования *Y. pestis* EV НИИЭГ не вызывает изменений в генах факторов патогенности и обеспечения жизнедеятельности возбудителя чумы, но модулирует ее белковый профиль, что сопровождается повышением протективного потенциала вакцинного штамма.

Ключевые слова: чума, чумная вакцина, *Y. pestis* EV НИИЭГ, азоксимера бромид, секвенирование, масс-спектрометрия.

Корреспондирующий автор: Гончарова Анастасия Юрьевна, e-mail: rusrap@microbe.ru.

Для цитирования: Гончарова А.Ю., Бугоркова С.А., Абдрашитова А.С., Щербакова Н.Е., Краснов Я.М., Германчук В.Г., Девдариани З.Л., Швиденко И.Г., Щуковская Т.Н. Влияние азоксимера бромида при добавлении в среду культивирования *Yersinia pestis* EV НИИЭГ на отдельные геномные и протеомные характеристики штамма. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2024; 3:81–87. DOI: 10.21055/0370-1069-2024-3-81-87

Поступила 05.03.2024. Отправлена на доработку 21.03.2024. Принята к публ. 23.05.2024.

A.Yu. Goncharova, S.A. Bugorkova, A.S. Abdrashitova, N.E. Shcherbakova, Ya.M. Krasnov,
V.G. Germanchuk, Z.L. Devdariani, I.G. Shvidenko, T.N. Shchukovskaya

Effect of Azoximer Bromide on Individual Genomic and Proteomic Characteristics of the Strain during Cultivation of *Yersinia pestis* EV NIEG

Russian Research Anti-Plague Institute “Microbe”, Saratov, Russian Federation

Abstract. The aim of the work was to study the effect of the azoximer bromide immunoadjuvant (polyoxidonium, PO) on certain molecular-genetic and proteomic properties of *Yersinia pestis* EV NIEG strain, when added to the culture medium. **Materials and methods.** *Y. pestis* EV NIEG was grown at 28 °C for 48 hours on LB agar pH 7.2 (Miller), with and without PO (EV+PO). Whole-genome sequencing of EV and EV+PO strains was performed on the Ion S5 XG generation II platform. Whole-genome SNP analysis and search for marker SNPs were conducted in the Wombac 2.0 program. Mass-spectra of *Y. pestis* EV extracts and EV+PO cells were recorded using a Microflex LT mass spectrometer. Protective properties of the test cultures were evaluated by the integral ImD₅₀ index in BALB/c mice when infected with *Y. pestis* 231(708). **Results and discussion.** Comparative analysis has not revealed deletions, insertions and single nucleotide polymorphisms in the structure of *Y. pestis* EV+PO strain genome leading to a violation of the production of pathogenicity, immunogenicity and ensuring the vital activity factors of the plague pathogen. The MALDI-TOF mass spectrometry has shown that *Y. pestis* EV+PO strains changed the intensity of 22 % of the total number of peaks in the range of 2000–20000 Da. Most of the altered peaks in the UniProtKB protein bank belong to uncharacterized proteins and metabolic proteins. At the same time, the ImD₅₀ was 2–3.3 times lower in cultures grown with the addition of PO than in *Y. pestis* EV. Thus, the addition of PO to *Y. pestis* EV NIEG culture medium does not cause changes in the genes of pathogenicity and vital activity support factors of plague pathogen, but modulates its protein profile, which is accompanied by an increase in the protective potential of the EV vaccine strain.

Key words: plague, plague vaccine, *Y. pestis* EV NIEG, azoximer bromide, sequencing, mass spectrometry.

Conflict of interest: The authors declare no conflict of interest.

Funding: The authors declare no additional financial support for this study.

Bioethics: Manipulations with animals, as well as their removal from the experiment, were approved by the Bioethics Commission of the Russian Anti-Plague Institute “Microbe” of the Rospotrebnadzor and were carried out in accordance with national and international guidelines for the care and humane use of animals.

Corresponding author: Anastasia Yu. Goncharova, e-mail: rusrapi@microbe.ru.

Citation: Goncharova A.Yu., Bugorkova S.A., Abdrashitova A.S., Shcherbakova N.E., Krasnov Ya.M., Germanchuk V.G., Devdariani Z.L., Shvidenko I.G., Shchukovskaya T.N. Effect of Azoximer Bromide on Individual Genomic and Proteomic Characteristics of the Strain during Cultivation of *Yersinia pestis* EV NIIЭГ. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2024; 3:81–87. (In Russian). DOI: 10.21055/0370-1069-2024-3-81-87

Received 05.03.2024. Revised 21.03.2024. Accepted 23.05.2024.

Goncharova A.Yu., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9994-7936>
Bugorkova S.A., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7548-4845>
Abdrashitova A.S., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1803-4156>
Shcherbakova N.E., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3261-6128>

Krasnov Ya.M., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4909-2394>
Germanchuk V.G., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8986-3640>
Shchukovskaya T.N., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8995-0895>

Вакцина чумная живая (ВЧЖ), применяемая в России для специфической профилактики чумы по эпидемическим показаниям, обеспечивает формирование защиты от чумной инфекции продолжительностью до года, что обуславливает в условиях длительного сохранения эпизоотической активности на территории природных очагов чумы необходимость проведения ежегодной ревакцинации [1]. На протяжении всей истории применения ВЧЖ предпринимались неоднократные попытки повышения иммуногенности вакцины, в том числе и за счет изменения условий культивирования вакцинного штамма *Yersinia pestis* EV линии НИИЭГ [2, 3].

Ранее нами был разработан и запатентован способ повышения иммуногенности вакцинного штамма чумного микроба [4], базирующийся на изменении условий его культивирования. Культуру штамма *Y. pestis* EV НИИЭГ выращивали на питательной среде с добавлением азоксимера бромида (полиоксидоний, ПО), что приводило к значимому повышению иммуногенности вакцинного штамма, регистрируемому по увеличению продукции специфических антител к капсульному антигену (F1) чумного микроба, и выраженному усилению защитного потенциала вакцины при моделировании бубонной формы чумы. Выбор иммуномодулятора неслучаен, так как известно, что ПО – водорастворимое N-окислованное производное полиэтиленпиперазина – обладает выраженным иммуномодулирующим, детоксицирующим, мембраностабилизирующим и антигенусиливающим эффектом [5, 6]. Более того, в работах по сочетанному применению ПО с ВЧЖ была показана эффективность его применения в различных схемах профилактики чумы [7, 8]. В то же время исследований механизма воздействия ПО на биологические свойства возбудителя чумы ранее не проводилось, но было установлено изменение морфометрических характеристик и адгезивных свойств вакцинного штамма *Y. pestis* EV НИИЭГ и других представителей рода *Yersinia*, выращенных на среде с добавлением ПО [9]. Изучение молекулярных механизмов взаимодействия ПО с макро- и микроорганизмом для выявления мишеней стимулирования иммуногенной и протективной активности ВЧЖ является актуальной задачей.

Цель исследования – изучение влияния иммуноадьюванта азоксимера бромида при добавлении его в среду культивирования на отдельные молекулярно-генетические и протеомные особенности штамма *Y. pestis* EV НИИЭГ.

Материалы и методы

Вакцинный штамм *Y. pestis* EV линии НИИЭГ (Pgm[–], pYT⁺, pYV⁺, pYP⁺) – три субкультуры, отличающиеся по году лиофилизации (EV1 – 2011 г., EV2 – 2018 г. и EV3 – 2021 г.), и вирулентный штамм основного подвида *Y. pestis* 231(708) (Pgm⁺, pYT⁺, pYV⁺, pYP⁺) получены из Государственной коллекции патогенных бактерий ФКУН Российский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора (Саратов). В эксперименте использовали мышей линии BALB/c массой (18±2) г, полученных из отдела экспериментальных животных с виварием ФКУН Российский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора. Манипуляции с животными, а также выведение их из эксперимента были одобрены Комиссией по биоэтике при ФКУН Российский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора и проводились в соответствии с национальными и международными руководящими принципами по уходу и гуманному использованию животных. Вторую генерацию штамма *Y. pestis* EV НИИЭГ выращивали при 28 °С в течение 48 ч на питательной среде агар LB, pH 7,2 (Miller), как с добавлением ПО в конечной концентрации 60 мкг/мл (EV+ПО), что соответствует его терапевтической концентрации при разовом введении человеку, так и без внесения в среду ПО (EV).

Защитное действие вакцинного штамма *Y. pestis* EV НИИЭГ при культивировании с ПО (группы: EV1+ПО, EV2+ПО, EV3+ПО) и без него (группы: EV1, EV2, EV3) определяли в условиях моделирования чумной инфекции по интегральному показателю ImD₅₀ (количество живых микробных клеток, выраженное в колониеобразующих единицах [КОЕ] и способное защитить через 21 сутки 50 % взятых в опыт животных от заражения вирулентным тест-штаммом) на мышах линии BALB/c. Три субкультуры *Y. pestis* EV НИИЭГ вводили подкожно соответствующим группам мышей BALB/c в дозах 2·10², 10³, 5·10³ и 2,5·10⁴ КОЕ. Заражение осуществляли на 21-е сутки после вакцинации подкожно вирулентным тест-штаммом основного подвида *Y. pestis* 231(708) в дозе 400 LD₅₀.

Выделение и очистку геномной ДНК культур штамма *Y. pestis* EV НИИЭГ выполняли согласно инструкции производителя с использованием коммерческого набора PureLink Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen, США). Полногеномное секвенирование штамма *Y. pestis* EV НИИЭГ, выращенного в стан-

дартных условиях (EV2) и на среде с добавлением ПО (EV2+ПО), проводили на платформе Ion S5 XG (Life technologies, США). Единичные чтения скорректированы с использованием программного обеспечения Ion Torrent Suite software версии 5.10 и собраны *de novo* в контиги с помощью программы Newbler gsAssembler версии 2.6. Далее единичные прочтения изучаемых субкультур штамма *Y. pestis* EV НИИЭГ, выращенных на среде с добавлением ПО, картировали на референтную последовательность штамма *Y. pestis* EV НИИЭГ, выращенного на среде без ПО, с помощью программного пакета DNA STAR Lasergene v.11.2 (DNA STAR Inc., США). Нуклеотидную последовательность штамма *Y. pestis* EV НИИЭГ предварительно аннотировали в геномном сервисе для прокариот RAST v.2.0 (<http://rast.nmpdr.org/rast.cgi>). Полногеномный SNP-анализ и поиск маркерных SNPs осуществляли в программе Wombac 2.0. Визуализацию и анализ полученных данных проводили с помощью программного обеспечения UGENE Unipro и MEGA5.

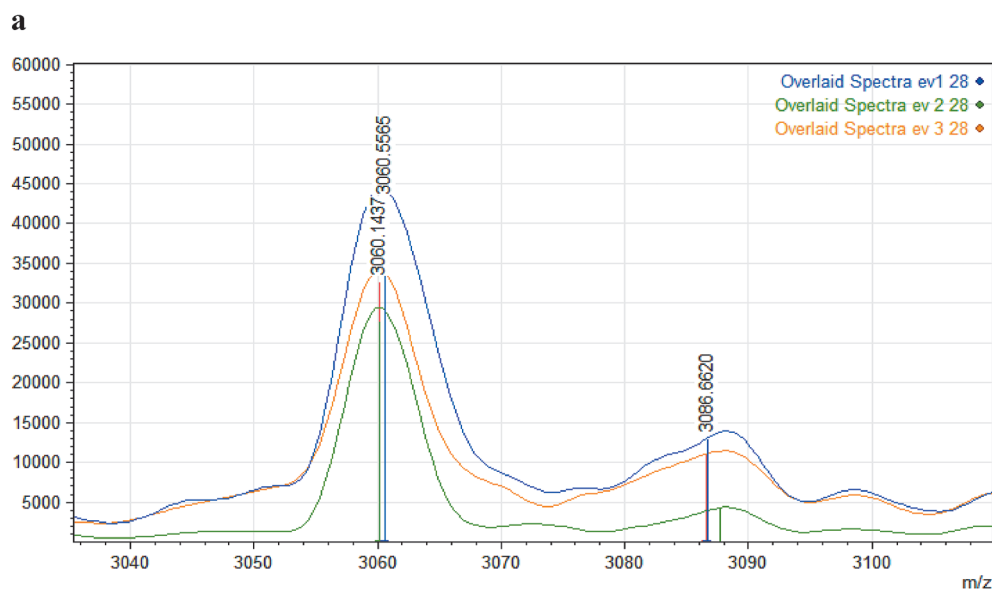
Для масс-спектрометрического анализа субкультуры штамма *Y. pestis* EV НИИЭГ (EV1, EV2, EV3 и EV1+ПО, EV2+ПО, EV3+ПО) выращивали в течение 48 ч при 28 °С, для каждой субкультуры готовили три образца белковых препаратов. Белковую экстракцию проводили в соответствии с МУ 4.2.3733-21 «Подготовка культур микроорганизмов I–II групп патогенности для анализа методом MALDI-TOF масс-спектрометрии и формирование баз данных референсных масс-спектров для автоматической идентификации микроорганизмов». Снятие масс-спектров экстрактов образцов проводили в автоматическом режиме на масс-спектрометре Microflex LT (Bruker Daltonics, Германия). В качестве матрицы применяли насыщенный раствор α-циано-4-гидроксикоричной кислоты. Анализируемый диапазон масса/заряд (m/z) составлял 2000–20000 Да. Для получения одиночного масс-спектра использовали 40 импульсов азотного лазера (частота 60 Гц). Сравнение пиков белковых масс-спектров проводили в программе общего доступа mMass (<http://www.mmass.org>). Идентификацию пептидов по значению m/z осуществляли с использованием международной базы белков UniProt (<http://www.uniprot.org/>). Интенсивность пиков измеряли в а.и. (абсолютная интенсивность).

Статистическую обработку данных проводили с использованием стандартного пакета программ Microsoft Office Excel 2016. Данные представляли в виде ($M \pm m$), где M – среднее значение, m – средняя квадратичная ошибка средней арифметической. Значимость различий между группами оценивали с использованием t -критерия Стьюдента. Различия между группами наблюдения считали статистически значимыми при $p < 0,05$. Взаимосвязь между переменными определяли с помощью корреляционно-регрессионного анализа (коэффициент корреляции Пирсона) и модели корреляционной матрицы.

Результаты и обсуждение

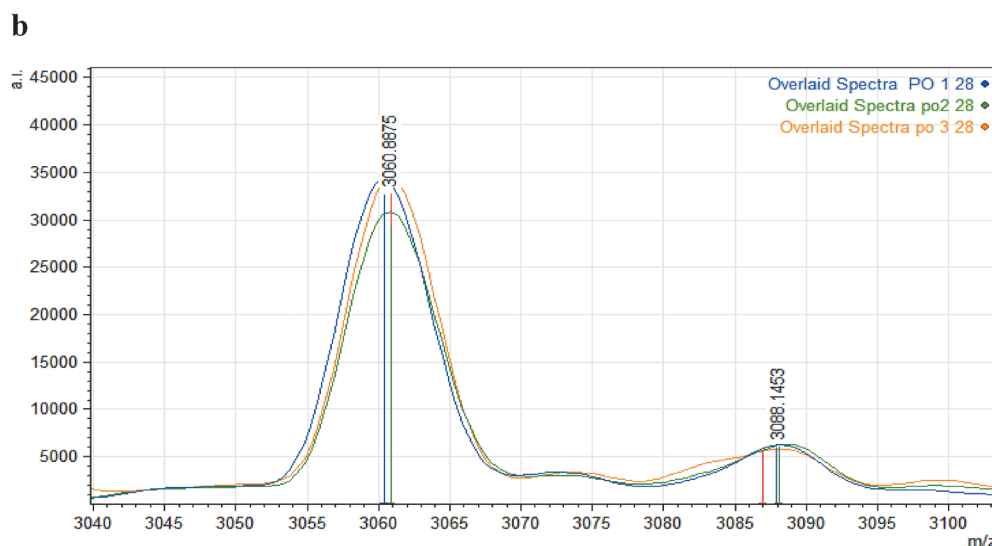
На первом этапе проведено полногеномное секвенирование штамма *Y. pestis* EV НИИЭГ, выращенного в стандартных условиях (EV) и на среде с добавлением ПО (EV+ПО). Проанализированы в двух повторностях 204 контига (EV) и 207 контигов (EV+ПО), общая длина собранного генома – 4421832 и 4421363 п.н., глубина покрытия – 67 и 64 соответственно, GC-состав – 47,4 % в обоих случаях. При проведении сравнительного анализа в структуре генома штамма *Y. pestis* EV+ПО делеций, инсерций и единичных нуклеотидных замен не обнаружено. По результатам анализа с применением программного обеспечения UGENE Unipro, MEGA5 и PATRIC в интересующих нас генах плазмидной и хромосомной локализации, отвечающих за иммуногенность, вирулентность (оперон *Cafl*, гены эффекторных белков внешней мембраны *yop*, активатора плазмидогена *pla*, *lcrV*), а также за адгезивные свойства чумного микроба (ген *ail*, гены аутопереносимых белков группы генов *yap* и *yad*, оперон *Psa*), вариативности генома у культур, выращенных на среде с добавлением ПО, не обнаружено. Следовательно, важные продукты, участвующие в патогенезе чумы и обеспечении жизнедеятельности чумного микроба, не претерпели изменений, поэтому характер воздействия ПО на протективные свойства чумного микроба может быть связан с изменениями уровня продукции определенных белков.

На следующем этапе с использованием метода MALDI-TOF масс-спектрометрии получена характеристика протеома в диапазоне от 2000 до 20000 Да субкультур вакцинного штамма, выращенных в обычных условиях и на среде с добавлением ПО. Для каждой субкультуры анализ проводили в трех повторках. Полученные масс-спектры обработаны и суммированы методом overlay для каждой субкультуры с получением индивидуального суперспектра. В результате у всех субкультур идентифицированы пики, характерные по описанию [10] для разных уровней таксономической идентификации: род *Yersinia* (m/z 4350, 5427, 6046, 6241 Да), группа *Y. pestis/pseudotuberculosis* (m/z 6637, 7224, 7783, 9268, 9659 Да), вид *Y. pestis* (m/z 3065 Да), что свидетельствует о валидности используемых образцов и достоверности полученных результатов. При сопоставлении результатов исследования масс-спектров субкультур штамма *Y. pestis* EV отмечена зависимость изменения интенсивности пиков (до 30 % от общего количества) у разных субкультур, отличающихся годом выращивания и последующего лиофильного высушивания. Добавление ПО в среду культивирования приводило к изменению еще 22 пиков, что проявлялось как условное «выравнивание» интенсивности пиков у всех субкультур *Y. pestis* EV+ПО. Если у субкультуры EV наблюдали конкретный пик, значительно превышающий средние значения, то на среде с добавлением ПО регистрировали его сниже-



MALDI-TOF масс-спектры пика m/z 3065 (фрагмент белка активатора плазминогена по банку белков UniProtKB) у субкультур *Y. pestis* EV (a) и *Y. pestis* EV+ПО (b)

MALDI-TOF mass spectra of peak m/z 3065 (plasminogen activator protein fragment across the UniProtKB protein bank) in subcultures of *Y. pestis* EV (a) and *Y. pestis* EV+ПО (b)



ние до среднестатистических значений. Так, при анализе масс-спектров у всех субкультур идентифицирован пик 3060 ($m/z \pm 5$ Да), который ранее был описан как видоспецифичный для штаммов *Y. pestis* [10] и идентифицируется в базе данных UniprotKB как фрагмент белка активатора плазминогена. Разница между максимальными и минимальными значениями интенсивности этого пика у культур, выращенных без добавления ПО, составляла 15157 а.и. (от 27789 до 42946 а.и.), а у субкультур EV1+ПО, EV2+ПО, EV3+ПО была всего 3656 а.и. (от 31128 до 34784 а.и.) (рисунок), что статистически отображается в кратном уменьшении ($p < 0,05$) ошибки среднего арифметического значений интенсивности пиков субкультур *Y. pestis* EV+ПО (табл. 1).

Дальнейший статистический анализ позволил выявить пики (m/z 2526, 2821, 3303, 4182, 6591, 7190 и 8643 Да), интенсивность которых на масс-спектрах субкультур *Y. pestis* EV достоверно отличалась ($p < 0,05$) от интенсивности пиков для субкультур *Y. pestis* EV+ПО (табл. 1). При проведении статистического анализа по поиску корреляционной

связи между отобранными протеинами (интенсивности соответствующих им пиков на масс-спектрах) с помощью модели корреляционной матрицы выполнено ранжирование оцениваемых показателей по сумме величин коэффициентов корреляции (при зависимости признака $p < 0,05$). В результате оказалось, что максимальное значение суммы коэффициентов корреляции, равное 5, установлено для протеина Sorporoporphyrinogen III oxidase (m/z 2526 Да), участвующего в ускорении процессов превращения колец I и III пропионовой кислоты в винильные группы при синтезе гема. Аналогичный анализ интенсивности пиков субкультур, отличающихся только годом лиофилизации, не выявил зависимости с данным пиком (m/z 2526 Да), но показал наличие корреляционных связей между протеинами, отвечающими за питательные потребности клетки, в частности метаболизм сахаров.

При оценке влияния азоксимера бромид на про- тективные свойства субкультур вакцинного штамма *Y. pestis* EV НИИЭГ по интегральному показателю ImD_{50} при моделировании бубонной формы чумы

Таблица 1 / Table 1

Продукты генов, отличающиеся у штамма *Y. pestis* EV НИИЭГ, выращенного на среде с ПО (EV+ПО) и без него (EV), найденные по банку белков UniProtKB

Gene products that differ in *Y. pestis* EV NIEG strain grown on the medium with PO (EV+PO) and without it (EV), found across the UniProtKB protein bank

Масса пика (m/z ±5 Да) Peak weight (m/z ±5 Da)	Средние значения интенсивности пиков, а.и., (M±m) Average peak intensities, a.i., (M±m)		Наименование протеина в <i>Y. pestis</i> EV НИИЭГ Protein name in <i>Y. pestis</i> EV NIEG	Длина протеина, а.о. Protein length, AA	Наименование гена в <i>Y. pestis</i> EV НИИЭГ Gene name in <i>Y. pestis</i> EV NIEG
	<i>Y. pestis</i> EV	<i>Y. pestis</i> EV+ПО (PO)			
2526	5459±1370	2589±465*	Coproporphyrinogen III oxidase	24	EGX45_02675
2821	7568±783	4510±642*	Glutathione S-transferase	27	EGX46_04045
3060	34474±3157	33466±829	Plasminogen	30	<i>pla</i>
3303	8007±2266	3675±526*	Putative glycosyl transferase	31	–
3634	10717±3004	7436±444	Putative membrane protein	32	–
3690	4424±1550	2251±71	Transposase remnant	31	YPA_CD0087
4182	2994±790	2264±117*	Holin	37	y2955
5149	23287±2205	21335±818	DNA-directed RNA polymerase beta chain	43	<i>rpoB</i>
5426	5265±1920	3037±223	50S ribosomal protein L34	46	<i>rpmH</i>
5527	14917±1710	12067±918	Copper resistance protein CopA	48	YPA_1871
6044	8323±2009	4828±337	Small toxic polypeptide	53	YP_0267
6591	6096±2904	2578±239*	Chromate transporter	60	y0809
7190	4171±1812	3655±204*	Exported protein	62	EGX46_00375
8643	12675±3137	12888±447*	Transposase	77	YP_pMT099
9659	2007±731	1213±119	DNA-binding protein HU-alpha	91	<i>hupA</i>
11053	5459±1370	2589±465*	Putative secreted protein	97	–

Примечания: а.и. – абсолютная интенсивность; а.о. – аминокислотные остатки; * p<0,05 – при сравнении с субкультурами штамма *Y. pestis* EV НИИЭГ.

Notes: a.i. – absolute intensity; AA – amino acid residue; * as compared to subcultures of *Y. pestis* EV NIEG strain without PO.

на мышцах линии BALB/c установлено, что введение ПО в состав среды культивирования приводило к достоверному повышению защитного потенциала вакцинного штамма *Y. pestis* EV НИИЭГ для выбранной биомодели, а также к увеличению продолжительности жизни животных (табл. 2). После заражения иммунизированных животных высоковирулентным штаммом *Y. pestis* 231(708), применяющимся в качестве заражающего тест-штамма при контроле ВЧЖ, регистрировали снижение ImD₅₀ в 2–3,3 раза для субкультур штамма *Y. pestis* EV+ПО по сравнению с ImD₅₀ для *Y. pestis* EV, культивируемых в стандартных условиях.

Использование препаратов с иммуномодулирующей активностью на фоне вакцинации изменяет баланс эндогенных цитокинов в организме и оказывает влияние на развитие антиген-специфического иммунного ответа [11]. Однако не меньший интерес представляет непосредственное воздействие иммуномодуляторов на биологические свойства вакцинного штамма, особенно если это приводит к повышению его иммуногенных и протективных характеристик. Ранее нами предложен способ повышения иммуногенности вакцинного штамма чумного микроба, предусматривающий его культивирование на питательной среде с добавлением азоксимера бромида [4]. Разработанный способ позволил получить культуру вакцинного штамма чумного микроба, об-

ладающую высокой иммуногенностью, без использования процедуры анимализации или клеточных культур. Ранее высказанное предположение о возможной связи изменения иммуногенности *Y. pestis* EV НИИЭГ и трансформирующего действия ПО, в частности изменения наномеханических свойств клеточной поверхности с изменением биосинтеза адгезинов [9], в данном исследовании не нашло подтверждения. При проведении сравнительного полногеномного SNP-анализа культур *Y. pestis* EV и *Y. pestis* EV+ПО в генах, кодирующих адгезины, а также в интересующих нас генах плазмидной и хромосомной локализации, отвечающих за иммуногенность и вирулентность, мутаций не обнаружено.

Результаты белкового профилирования с использованием метода MALDI-TOF масс-спектрометрии зависят от условий культивирования, особенностей воздействия химических и физических факторов на культуры, длительности их хранения [12, 13]. Это подтверждают и наши данные по изменениям, выявленным в значительном количестве пиков диапозона до 20000 Да у субкультур вакцинного штамма с разными сроками хранения, выращенных на среде без добавления ПО. При этом обращает на себя внимание тот факт, что у 22 % пиков интенсивность изменялась при добавлении в среду культивирования ПО. Характер действия ПО на прокариотические клетки, выражающийся в определенном «выравни-

Таблица 2 / Table 2

Протективные свойства субкультур вакцинного штамма *Y. pestis* EV НИИЭГ, выращенных с добавлением в среду культивирования ПО и без него, при заражении вирулентным тест-штаммом *Y. pestis* 231(708) в дозе 400 LD₅₀

Protective properties of subcultures of the vaccine strain EV NIEG grown with and without addition of azoximer bromide (PO) to culture medium during infection with virulent test strain *Y. pestis* 231(708) at a dose of 400 LD₅₀

Группа Group	Число животных (выжившие / общее количество) Number of animals (survived/total)	Средняя продолжительность жизни (сутки) Average life span (days) M±m	ImD ₅₀ KOE CFU
1EV	15/37	4,6±0,6	0,41·10 ⁴ (4127)
1EV +ПО (PO)	22/35	7,0±0,1*	0,12·10 ⁴ (1241)*
2EV	12/32	5,0±1,0	0,43·10 ⁴ (4304)
2EV +ПО (PO)	21/39	6,6±0,2*	0,22·10 ⁴ (2233)*
3EV	14/40	4,4±0,3	0,58·10 ⁴ (5860)
3EV +ПО (PO)	23/40	5,3±0,3*	0,17·10 ⁴ (1728)*
Физиологический раствор PBS PBS saline solution	0/10	3,7±0,5	—

Примечание: * p<0,05 – при сравнении с субкультурами штамма *Y. pestis* EV НИИЭГ.

Note: * p<0.05 – as compared to subcultures of *Y. pestis* EV NIEG strain without PO.

вании» интенсивности пиков изученного диапазона, вполне согласуется с заявленным его иммуномодулирующим потенциалом на эукариотические клетки [5]. Так, например, ПО усиливает продукцию фактора некроза опухоли (ФНО) клетками крови только у лиц с исходно сниженным уровнем синтеза этого цитокина и не оказывает влияния или даже несколько понижает продукцию ФНО у лиц с исходно повышенным уровнем [6]. Данный механизм объясняется наличием N-оксидных и карбоксильных групп в структуре молекулы ПО, которые активно взаимодействуют с рецепторами клеток макро- и микроорганизмов. Вероятно, взаимодействие активных групп молекул ПО с белками поверхностных структур чумного микроба, так же как и других патогенов, оказывает модулирующее действие на различные факторы, приводящие к лучшей презентации *Y. pestis* EV НИИЭГ иммунокомпетентным клеткам макроорганизма, способствуя увеличению иммунологической активности вакцинного штамма [14, 15]. В пользу схожести механизмов иммуномодуляции ПО свидетельствуют данные, полученные при сочетании введении животным вакцинного штамма и иммуномодулятора [8], когда, как и в случае с выращиванием вакцинного штамма на среде с добавлением ПО, регистрировали снижение ImD₅₀ в 2–3,3 раза по сравнению со штаммом, выращенным в обычных условиях.

Таким образом, в настоящем исследовании по данным полногеномного секвенирования мутаций при добавлении ПО в среду культивирования *Y. pestis* EV НИИЭГ в изученных генах факторов патогенности и обеспечения жизнедеятельности возбудителя чумы не выявлено. Установлена модуляция анализируемой части белкового профиля, сопровождающаяся повышением протективной активности штамма. Дальнейшая детализация механизмов влияния ПО на вакцинный штамм EV нуждается в расширении

арсенала применяемых протеомных и биоинформатических технологий и увеличении спектра изучаемых белков в диапазоне выше 20000 Да.

Конфликт интересов. Авторы подтверждают отсутствие конфликта финансовых/нефинансовых интересов, связанных с написанием статьи.

Финансирование. Авторы заявляют об отсутствии дополнительного финансирования при проведении данного исследования.

Биоэтика. Манипуляции с животными, а также выведение их из эксперимента были одобрены Комиссией по биоэтике при ФКУН Российский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора и проводились в соответствии с национальными и международными руководящими принципами по уходу и гуманному использованию животных.

Список литературы

1. Микшис Н.И., Кутырев В.В. Современное состояние проблемы разработки вакцин для специфической профилактики чумы. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2019; 1:50–63. DOI: 10.21055/0370-1069-2019-1-50-63.
2. Гостищева С.Е., Абзаева Н.В., Ракитина Е.Л., Пономаренко Д.Г., Костюченко М.В., Катунина Л.С., Логвиненко О.В., Иванова Г.Ф., Курилова А.А. Сравнительный анализ иммуногенной активности чумной вакцины в зависимости от среды выращивания. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2021; 2:148–51. DOI: 10.21055/0370-1069-2021-2-148-151.
3. Гостищева С.Е., Абзаева Н.В., Иванова Г.Ф., Катунина Л.С., Ростовцева Д.В., Костроминов А.В. Мониторинг стабильности вакцины чумной живой, приготовленной с использованием питательной среды на основе гидролизата кукурузного экстракта сгущенного. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2019; 4:37–40. DOI: 10.21055/0370-1069-2019-4-37-40.
4. Шуковская Т.Н., Бугоркова С.А., Гончарова А.Ю., Кудрявцева О.М. Способ повышения иммуногенности вакцинного штамма чумного микроба. Патент РФ № 2727258, опубл. 21.07.2020. Бюл. № 21.
5. Пинегин Б.В., Некрасов А.В., Хаитов Р.М. Иммуномодулятор полиоксидоний: механизмы действия и аспекты клинического применения. *Цитокины и воспаление*. 2004; 3(3):41–7.
6. Петров Р.В., Хаитов Р.М., Некрасов А.В., Атагулаханов Р.И., Пучкова Н.Г., Иванова А.С., Пинегин Б.В., Хамидуллина К.Ф., Дамбаева С.В., Климова С.В. Полиоксидоний: механизм действия и клиническое применение. *Медицинская иммунология*. 2000; 2(3):271–8.

7. Каральник Б.В., Пономарева Т.С., Дерябин П.Н., Денисова Т.Г., Мельникова Н.Н., Тугамбаев Т.И., Атшабар Б.Б., Закарян С.Б. Влияние иммуномодуляции на иммуногенную и протективную активность живой чумной вакцины. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2014; 6:108–12.
8. Гончарова А.Ю., Бугоркова С.А., Кудрявцева О.М., Кожевников В.А., Кравцов А.Л., Каштанова Т.Н., Шуковская Т.Н. Экспериментальная оценка эффективности применения вакцинного штамма *Yersinia pestis* EV НИИЭГ в сочетании с иммуномодуляторами. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2020; 2:71–7. DOI: 10.21055/0370-1069-2020-2-71-77.
9. Шуковская Т.Н., Гончарова А.Ю., Бугоркова С.А., Ерохин П.С., Кудрявцева О.М. Оценка действия азоксимера бромид (полиоксидония) на адгезивные свойства вакцинного штамма *Yersinia pestis* EV НИИЭГ по данным атомно-силовой микроскопии. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2021; 98(3):298–307. DOI: 10.36233/0372-9311-93.
10. Lasch P., Drevinek M., Nattermann H., Grunow R., Stämmler M., Dieckmann R., Schwecke T., Naumann D. Characterization of *Yersinia* using MALDI-TOF mass spectrometry and chemometrics. *Anal. Chem.* 2010; 82(20):8464–75. DOI: 10.1021/ac101036s.
11. Авдеева Ж.И., Алпатова Н.А., Акользина С.Е., Медуницын Н.В. Цитокины и вакцины. *Тихоокеанский медицинский журнал*. 2009; 3:22–7.
12. Bove C.G., De Angelis M., Gatti M., Calasso M., Neviani E., Gobetti M. Metabolic and proteomic adaptation of *Lactobacillus rhamnosus* strains during growth under cheese-like environmental conditions compared to de Man, Rogosa, and Sharpe medium. *Proteomics*. 2012; 12(21):3206–18. DOI: 10.1002/pmic.201200157.
13. Seibold E., Maier T., Kostrzewa M., Zeman E., Splettstoesser W. Identification of *Francisella tularensis* by whole-cell matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry: fast, reliable, robust, and cost-effective differentiation on species and subspecies levels. *J. Clin. Microbiol.* 2010; 48(4):1061–9. DOI: 10.1128/JCM.01953-09.
14. Крылов Д.А., Чайникова И.Н., Перунова Н.Б., Челпаченко О.Е., Паньков А.С., Смолягин А.И., Вальшев А.В. Влияние иммуномодулятора полиоксидония на биологические свойства микроорганизмов. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2003; 4:74–8.
15. Харсеева Г.Г., Москаленко Е.П., Алутина Э.Л., Бредо А.М. Влияние полиоксидония на адгезивные свойства *Corynebacterium diphtheriae*. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2009; 2:11–5.

References

1. Mikshis N.I., Kuttyrev V.V. [Current state of the problem of vaccine development for specific prophylaxis of plague]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2019; (1):50–63. DOI: 10.21055/0370-1069-2019-1-50-63.
2. Gostishcheva S.E., Abzaeva N.V., Rakitina E.L., Ponomarenko D.G., Kostyuchenko M.V., Katunina L.S., Logvinenko O.V., Ivanova G.F., Kurilova A.A. [Comparative analysis of the immunogenic activity of the plague vaccine depending on the growing medium]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2021; (2):148–51. DOI: 10.21055/0370-1069-2021-2-148-151.
3. Gostishcheva S.E., Abzaeva N.V., Ivanova G.F., Katunina L.S., Rostovtseva D.V., Kostrominov A.V. [Monitoring of stability of the live plague vaccine produced using condensed corn steep extract hydrolysate-based nutrient medium]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2019; (4):37–40. DOI: 10.21055/0370-1069-2019-4-37-40.
4. Shchukovskaya T.N., Bugorkova S.A., Goncharova A.Yu., Kudryavtseva O.M. [Method for increasing immunogenicity of a vaccine strain of plague microbe]. RF Patent No. 2727258, publ. 21 July 2020. Bull. No. 21.
5. Pinegin B.V., Nekrasov A.V., Khaitov R.M. [Polyoxidonium immunomodulator: mechanisms of action and aspects of clinical

- use]. *Tsitokiny i Vospalenie [Cytokines and Inflammation]*. 2004; 3(3):41–7.
6. Petrov R.V., Khaitov R.M., Nekrasov A.V., Attaulakhanov R.I., Puchkova N.G., Ivanova A.S., Pinegin B.V., Khamidullina K.F., Dambaeva S.V., Klimova S.V. [Polyoxidonium – mechanisms of action and clinical relevance]. *Meditsinskaya Immunologiya [Medical Immunology]*. 2000; 2(3):271–8.
7. Karal'nik B.V., Ponomareva T.S., Deryabin P.N., Denisova T.G., Mel'nikova N.N., Tugambaev T.I., Atshabar B.B., Zakaryan S.B. [Effect of immune modulation on immunogenic and protective activity of a live plague vaccine]. *Zhurnal Mikrobiologii, Epidemiologii i Immunobiologii [Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology]*. 2014; (6):108–12.
8. Goncharova A.Yu., Bugorkova S.A., Kudryavtseva O.M., Kozhevnikov V.A., Kravtsov A.L., Kаштанова Т.Н., Shchukovskaya T.N. [Experimental evaluation of application of the vaccine strain *Yersinia pestis* EV NIEG in combination with immune-modulators]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2020; (2):71–7. DOI: 10.21055/0370-1069-2020-2-71-77.
9. Shchukovskaya T.N., Goncharova A.Y., Bugorkova S.A., Erokhin P.S., Kudryavtseva O.M. [Evaluation of azoximer bromide (polyoxidonium) influence on the adhesive properties of the *Yersinia pestis* EV NIEG vaccine strain by atomic force microscopy]. *Zhurnal Mikrobiologii, Epidemiologii i Immunobiologii [Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology]*. 2021; 98(3):298–307. DOI: 10.36233/0372-9311-49.
10. Lasch P., Drevinek M., Nattermann H., Grunow R., Stämmler M., Dieckmann R., Schwecke T., Naumann D. Characterization of *Yersinia* using MALDI-TOF mass spectrometry and chemometrics. *Anal. Chem.* 2010; 82(20):8464–75. DOI: 10.1021/ac101036s.
11. Avdeeva Zh.I., Alpatova N.A., Akolizina S.E., Medunitsyn N.V. [Cytokines and vaccines]. *Tikhookeanskij Meditsinskij Zhurnal [Pacific Medical Journal]*. 2009; (3):22–7.
12. Bove C.G., De Angelis M., Gatti M., Calasso M., Neviani E., Gobetti M. Metabolic and proteomic adaptation of *Lactobacillus rhamnosus* strains during growth under cheese-like environmental conditions compared to de Man, Rogosa, and Sharpe medium. *Proteomics*. 2012; 12(21):3206–18. DOI: 10.1002/pmic.201200157.
13. Seibold E., Maier T., Kostrzewa M., Zeman E., Splettstoesser W. Identification of *Francisella tularensis* by whole-cell matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry: fast, reliable, robust, and cost-effective differentiation on species and subspecies levels. *J. Clin. Microbiol.* 2010; 48(4):1061–9. DOI: 10.1128/JCM.01953-09.
14. Krylov D.A., Chaynikova I.N., Perunova N.B., Chelpachenko O.E., Pan'kov A.S., Smolyagin A.I., Valyshev A.V. [Effect of a polyoxidonium immunoregulator on the biological properties of microorganisms]. *Zhurnal Mikrobiologii, Epidemiologii i Immunobiologii [Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology]*. 2003; (4):74–8.
15. Kharseeva G.G., Moskalenko E.P., Alutina E.L., Bredov A.M. [Influence of polyoxidonium on adhesive properties of *Corynebacterium diphtheriae*]. *Zhurnal Mikrobiologii, Epidemiologii i Immunobiologii [Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology]*. 2009; (2):11–5.

Authors:

Goncharova A.Yu., Bugorkova S.A., Abdrashitova A.S., Shcherbakova N.E., Krasnov Ya.M., Germanchuk V.G., Devdariani Z.L., Shvidenko I.G., Shchukovskaya T.N. Russian Research Anti-Plague Institute “Microbe”. 46, Universitetskaya St., Saratov, 410005, Russian Federation. E-mail: rusrapi@microbe.ru.

Об авторах:

Гончарова А.Ю., Бугоркова С.А., Абдрашитова А.С., Щербакова Н.Е., Краснов Я.М., Германчук В.Г., Девдариани З.Л., Швиденко И.Г., Шуковская Т.Н. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». Российская Федерация, 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: rusrapi@microbe.ru.