

**ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА ПО НАДЗОРУ В СФЕРЕ ЗАЩИТЫ ПРАВ  
ПОТРЕБИТЕЛЕЙ И БЛАГОПОЛУЧИЯ ЧЕЛОВЕКА**

Федеральное казенное учреждение здравоохранения  
«Иркутский ордена Трудового Красного Знамени научно-исследовательский  
противочумный институт Сибири и Дальнего Востока»

*На правах рукописи*

**МУХТУРГИН Геннадий Борисович**

**ЗАКОНОМЕРНОСТИ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ КЛЕТОК ИММУННОЙ  
СИСТЕМЫ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ЖИВОТНЫХ  
С *YERSINIA PESTIS* РАЗНОГО ПЛАЗМИДНОГО СОСТАВА**

**(экспериментальное исследование)**

14.03.03 – патологическая физиология

**Диссертация на соискание ученой степени  
кандидата медицинских наук**

**Научный руководитель:**

доктор биологических наук  
В.И. Дубровина

Иркутск – 2020

## СОДЕРЖАНИЕ

	Стр.
ВВЕДЕНИЕ .....	5
ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ .....	15
ГЛАВА 1 СОВРЕМЕННОЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЕ О МЕХАНИЗМАХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ <i>YERSINIA PESTIS</i> С КЛЕТКАМИ ОРГАНИЗМА ...	15
ГЛАВА 2 МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ .....	36
2.1 Экспериментальные животные.....	36
2.2 Штаммы чумного микроба .....	37
2.3 Питательные среды.....	38
2.4 Молекулярно-биологический метод определения плазмидного со- става.....	38
2.5 Определение активности ферментов патогенности чумного мик- роба.....	39
2.5.1 Глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа.....	39
2.5.2 Супероксиддисмутаза.....	39
2.5.3 Общая перекись разрушающая активность.....	40
2.5.4 Протеолитическая активность.....	42
2. 6 Определение адгезивной активности чумного микроба.....	43
2. 7 Получение макрофагов, полиморфноядерных лейкоцитов и лим- фоцитов.....	44
2.7.1 <i>Получение резидентных перитонеальных макрофагов.....</i>	44
2.7.2 <i>Получение полиморфноядерных лейкоцитов.....</i>	45
2.7.3 <i>Получение лимфоцитов.....</i>	45
2.8 Определение фагоцитарной активности макрофагов .....	46
2.9 Определение бактерицидной активности фагоцитов .....	47
2.9.1 <i>НСТ-тест .....</i>	47
2.9.2 <i>Активность глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы .....</i>	48
2.9.3 <i>Активность миелопероксидазы.....</i>	49

2.9.4 Содержание неферментных катионных белков.....	49
2.9.5 Активность супероксиддисмутазы.....	49
2.9.6 Перекись разрушающая активность.....	50
2.10 Оценка активации тучных клеток.....	51
2.11 Подготовка образцов клеток крови для исследования в условиях <i>in vitro</i> на проточном цитометре.....	51
2.12 Подготовка образцов крови инфицированных экспериментальных животных для исследования на проточном цитометре.....	52
2.13 Определение фенотипа клеток крови.....	53
2.13.1 Титрование антител.....	53
2.13.2 Приготовление раствора реагентов.....	54
2.13.3 Окрашивание клеток крови.....	54
2.13.4 Определение относительного и абсолютного количества клеток крови.....	55
2.14 Гистологические методы исследований.....	56
2.15 Статистические методы.....	57
ГЛАВА 3 РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ.....	58
3.1 Антифагоцитарные свойства штаммов <i>Y. pestis</i> с разным плазмидным составом.....	58
3.1.1 Характеристика плазмидного состава <i>Y. pestis</i> основного и алтайского подвидов .....	58
3.1.2 Адгезивные и поглонительные свойства <i>Y. pestis</i> с разным плазмидным составом.....	60
3.1.3 Супероксиддисмутазная, глюкозо-6-фосфатдегидрогеназная и перекись разрушающая активности <i>Y. pestis</i> с разным плазмидным составом.....	63
3.2 Оценка <i>in vitro</i> состояния клеток иммунной системы морской свинки при взаимодействии с <i>Y. pestis</i> исходных и дефектных по плазмидному составу.....	

мидному составу штаммов.....	70
3.2.1 Поглотительная способность фагоцитов при взаимодействии с <i>Y. pestis</i> .....	70
3.2.2 Бактерицидные механизмы фагоцитоза чумного микроба с разным плазмидным составом.....	74
3.3 Популяционный состав клеток крови и перитонеальной жидкости лабораторных животных при экспериментальной чумной инфекции .....	80
3.3.1 Динамика изменения популяционного состава мононуклеарных клеток перитонеальной жидкости белых мышей .....	80
3.3.2 Субпопуляционный состав клеток крови белых мышей .....	85
3.4 Морфологические изменения в иммунокомпетентных органах белых мышей при экспериментальной чумной инфекции.....	94
ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....	101
ВЫВОДЫ .....	111
ПЕРЕЧЕНЬ СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ .....	112
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ.....	115

## ВВЕДЕНИЕ

### Актуальность проблемы

Чума – природно-очаговая особо опасная инфекционная болезнь, возбудителем которой является *Yersinia pestis*. Природные очаги этого тяжелейшего инфекционного заболевания встречаются в Евразии, на Африканском и Американском континентах. По данным ВОЗ только за пять лет (2010-2015 гг.) в мире зарегистрировано 3248 случаев заболевания людей чумой, из них 584 случая закончились смертью [49]. Современный период характеризует повышение эпизоотической активности в ряде природных очагов чумы [157, 162, 163], возрастание вероятности распространения инфекции на энзоотичной территории и риск диссеминации чумы за ее пределы, а также возможность применения возбудителя чумы в качестве агента биотерроризма [185, 214]. Увеличение миграции населения, коммерческий туризм, биотерроризм, военные конфликты и чрезвычайные ситуации в результате стихийных бедствий и техногенных катастроф усиливают не только потенциальную, но и реальную опасность завоза этой инфекции в любую страну мира [14, 28, 30, 86, 207, 221].

На территории Российской Федерации зарегистрировано 11 природных очагов чумы. В настоящее время Горно-Алтайский высокогорный природный очаг, расположенный на территории Кош-Агачского района Республики Алтай, является одним из наиболее активных. Повышение эпидемического потенциала этого очага связывают с заносом и укоренением в местных биоценозах нетипичных для этой территории штаммов основного подвида *Y. pestis subsp. pestis* и общим ростом эпизоотической активности [10, 14, 35].

В 2014-2016 гг. в Кош-Агачском районе Республики Алтай зарегистрировано три случая заболевания местных жителей бубонной чумой, что послужило основанием проведения комплекса профилактических мероприятий и научных исследований по изучению молекулярно-физиологических свойств возбудителя [4, 35, 43, 44, 120]. Все это обуславливает особое внимание к вопросам противодей-

ствия распространению, профилактики болезни и всестороннему изучению механизмов резистентности патогена от клеточного и гуморального звена врожденного иммунитета хозяина [3, 58, 83, 106, 107, 124, 133, 141, 151].

### **Степень разработанности темы исследования**

Накопленные к настоящему времени материалы однозначно свидетельствуют о том, что патогенность возбудителя чумы является биологически сложным полидетерминантным признаком, находящимся под контролем регуляторных систем как хромосомных, так и плазмидных генов, которые ответственны за синтез макромолекул, принимающих участие как в развитии генерализованного инфекционного процесса, так и при бубонной форме чумы [12, 30, 39, 94, 198 и др.]. Способность многих патогенных бактерий к паразитированию в фагоцитах, играющая важную роль в патогенезе инфекции, обусловлена в том числе и наличием у них плазмид вирулентности.

В связи с обострением эпидемиологической обстановки в Горно-Алтайском высокогорном природном очаге чумы особую актуальность приобретают исследования *Y. pestis* subsp. *pestis* и *Y. pestis* subsp. *altaica*, циркулирующих в Тувинском и Горно-Алтайском высокогорном природных очагах, поскольку они имеют выраженные особенности и дискретность, обусловленные постоянным селективным воздействием различных биотических и абиотических факторов [15, 24, 28, 35, 43, 44, 58, 91]. Одним из основных свойств, по которым проявляется атипизм фено- и генотипических свойств штаммов *Y. pestis*, изолированных в Горно-Алтайском высокогорном природном очаге чумы, является обнаружение природных изолятов, не содержащих резидентные плазмиды рYV и рYP в отдельные годы [12, 18, 112]. Отличительным признаком тувинских штаммов чумного микроба является наличие в геноме дополнительной плазмиды рTP33. Высказано предположение, что рTP33 является кольцевым геномом фага, который содержит гены фагового морфогенеза, а также гены двухкомпонентной системы белков токсин-антитоксин YoeB/YefM, действующей на репликативный аппарат бактерий, а также, что она играет роль в процессе колонизации преджелудка блох, обеспечи-

вая большую прочность экзополисахаридного матрикса биопленки [4, 125]. Предположительно, белки, кодируемые этой плазмидой, являются факторами адаптации штаммов *Y. pestis* к условиям конкретных ландшафтно-географических биоценозов природных очагов чумы [4, 81, 125, 129, 204]. Возможно, плазида рТР33 играет роль в патогенности этих штаммов [4, 125].

Установлено, что атипичные варианты *Y. pestis* обладают способностью вызывать затяжные формы инфекционного процесса и, возможно, имеют значение в длительном поддержании энзоотии и сохранении возбудителя в межэпизоотический период [22, 165].

Также показано, что зависимость между вирулентностью возбудителя и степенью выраженности индуцированной им иммунодепрессии расценивается как важнейший фактор патогенности и является необходимым условием развития острого инфекционного процесса [19, 143]. В связи с этим, исследования, посвященные изучению роли плазмид чумного микроба в организации его метаболического статуса и вирулентности, не утратили актуальность.

Исследования динамики изменений в органах периферической иммунной системы при чуме касаются в основном морфофункциональной характеристики иммунокомпетентных органов у экспериментальных животных как при иммунизации вакцинным штаммом *Y. pestis* EV НИИЭГ, так и на фоне иммуномодуляции нанокомпозитами, арабиногалактаном и полиоксидонием [20, 25, 79, 98]. Участие центральных и периферических органов иммунной системы в реализации иммунных реакций и особенностей течения болезни, вызванной возбудителем чумы с разным составом плазмид, до настоящего времени мало исследованы.

Таким образом, сопоставление свойств штаммов, выделенных на территории Тувинского и Горно-Алтайского природных очагов и их изогенных вариантов, изучение молекулярно-физиологических механизмов взаимодействия чумного микроба с разным плазмидным составом и клеток иммунной системы, а также морфофункционального состояния иммунокомпетентных органов помимо научного интереса к раскрытию механизмов и особенностей иммуно- и патогене-

за чумы, будут способствовать пониманию и экспериментальному обоснованию факторов, обеспечивающих резистентность патогена к системам врожденного иммунитета хозяина.

**Цель исследования** – выявить особенности взаимодействия клеток иммунной системы экспериментальных животных со штаммами *Y. pestis* в зависимости от их плазмидного состава.

Для реализации поставленной цели последовательно решались следующие **задачи**:

1. Оценить состояние кислородзависимого, нитроксидзависимого и кислороднезависимого метаболизма клеток фагоцитарной системы экспериментальных животных, инфицированных *Y. pestis* с разным плазмидным составом.

2. Выявить закономерности морфофункциональных изменений в иммунокомпетентных органах и популяционного состава клеток перитонеальной жидкости экспериментальных животных, инфицированных *Y. pestis* с разным плазмидным составом.

3. Установить особенности функционального состояния и субпопуляционного состава клеток крови белых мышей, инфицированных *Y. pestis* с разным плазмидным составом.

### **Научная новизна работы**

Получены новые данные об антифагоцитарных и цитотоксических свойствах штаммов *Y. pestis*, изолированных в Тувинском и Горно-Алтайском природных очагах чумы, и их изогенных вариантов, проявляющихся разной способностью к разрушению перекиси водорода и адгезивной активности. Установлено, что высокие показатели перекись разрушающей активности чумного микроба характерны для бактерий с наличием плазмиды рУР.

При проведении комплексного сравнительного исследования особенностей взаимодействия клеток иммунной системы экспериментальных животных (белых мышей и морских свинок) со штаммами *Y. pestis*, отличающихся по плазмидному профилю, выявлены различия по степени активации бактерицидного потенциала



фагоцитов, пролиферации иммунокомпетентных клеток и дегрануляции тучных клеток.

Выявлены различия в морфологических изменениях иммунокомпетентных органов животных при экспериментальной чумной инфекции, которые проявляются разной степенью выраженности патологического процесса и активации иммунного ответа, зависящих от плазмидного состава *Y. pestis*.

Увеличение площади Т-зависимых зон в иммунокомпетентных органах белых мышей, инфицированных селекционными штаммами *Y. pestis* subsp. *altaica* и *Y. pestis* subsp. *pestis*, у которых отсутствуют плазмиды рУР и рУV свидетельствует об активации клеточного звена иммунитета и снижении плазмоцитарной реакции.

Предложена и научно обоснована концептуальная схема механизмов действия чумного микроба с разным плазмидным спектром на функциональное состояние клеток иммунной системы.

### **Теоретическое и практическое значение работы**

На основании проведенных исследований показано, что инфекционный процесс, вызванный введением белым мышам штаммов *Y. pestis* subsp. *pestis* с полным набором плазмид (рУР<sup>+</sup>рУV<sup>+</sup>рУТ<sup>+</sup>рТР33<sup>+</sup>), в отличие от штаммов с отсутствием рУР, рУV или рУТ проявляется тяжестью течения и гибелью животных на ранние сроки наблюдения (3-6 сутки).

В ходе исследований получены новые данные о механизмах реализации патогенного потенциала, обусловленного особенностями плазмидного состава штаммов *Y. pestis*, изолированных в Тувинском и Горно-Алтайском природных очагах чумы и их изогенных вариантов, которые проявляются в антифагоцитарных и цитотоксических свойствах, адгезивной и общей перекись разрушающей активности чумного микроба.

Результаты сравнительного исследования позволили установить ряд важнейших параметров морфологических изменений в иммунокомпетентных органах экспериментальных животных в динамике инфекционного процесса, вызванного

штаммами *Y. pestis* с разным плазмидным спектром, которые проявляются в различной степени активации бактерицидного потенциала клеток иммунной системы, пролиферации клеток крови и их популяционном составе, а также дегрануляции тучных клеток.

Показано, что штаммы чумного микроба, у которых отсутствует одна из плазмид (pYP или pYV), имеют достоверно низкие показатели адгезивности, вызывают менее выраженные процессы дегрануляции тучных клеток, а также в отношении этих штаммов отмечено повышение показателей фагоцитарной и бактерицидной активности фагоцитов (ФИП, НСТ-тест, МПО).

Эти данные дополняют теоретические знания и определяют направления изысканий в области изучения процессов формирования резистентности макроорганизма к возбудителю чумы. Полученные в ходе экспериментов данные могут быть использованы при изучении молекулярно-генетических механизмов патогенеза инфекционного процесса и направлений его развития.

Результаты исследований послужили основой для разработки и модификации методов изучения бактерицидных механизмов фагоцитоза и иммунной перестройки организма, которые отражены в методических рекомендациях – «Использование показателей адгезивной активности *Yersinia pestis* для оценки вирулентности» (Иркутск, 2012); «Фотометрическое определение поглотительной способности фагоцитов экспериментальных животных с применением 96-луночных плоскодонных планшет» (Иркутск, 2013); «Обеззараживание образцов крови, содержащих *Yersinia pestis*, для проведения цитофлуориметрических исследований» (Иркутск, 2015); «Определение протеолитической, супероксиддисмутазной и общей перекись разрушающей активности чумного микроба с применением фотометрического анализатора» (Иркутск, 2015).

Научные и практически значимые материалы исследований внедрены в практику научно-исследовательской работы ФКУЗ Иркутского научно-исследовательского противочумного института Роспотребнадзора, ФГБНУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека», филиал ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального обра-

зования» Минздрава РФ, включены в лекционные курсы при подготовке кадров учреждений Роспотребнадзора и других ведомств по программам дополнительного профессионального образования при ФКУЗ Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора.

### **Методология и методы исследования**

В работе использованы частные и общенаучные методы исследования (биологические, микробиологические, биохимические, иммуноцитометрические, гистологические и статистические). Биологическим методом определяли иммунизирующую дозу и LD<sub>50</sub>. Микробиологическими методами определяли обсемененность органов экспериментальных животных в динамике инфекционного процесса. Биохимические методы включали определение бактерицидных механизмов фагоцитов экспериментальных животных. Иммуноцитометрическими методами определяли функциональную способность клеток крови экспериментальных животных. Гистологические методы включали изучение макро- и микрокартины, а также морфометрию структурных компонентов иммунокомпетентных органов. Все полученные материалы статистически обработаны стандартными методами.

### **Положения, выносимые на защиту**

1. Антифагоцитарные и цитотоксические свойства штаммов *Y. pestis*, изолированных в Тувинском и Горно-Алтайском природных очагах чумы, и их изогенных вариантов проявляются разной способностью к разрушению перекиси водорода и адгезивной активности. Высокие показатели перекись разрушающей активности чумного микроба характерны для штаммов бактерий с наличием плазмиды pYP, а адгезивные свойства – pYV.

2. Морфологические изменения в иммунокомпетентных органах экспериментальных животных и дегрануляция тучных клеток при экспериментальной чумной инфекции зависят от плазмидного состава *Y. pestis*. Выявлены различия по степени активации фагоцитарного и бактерицидного потенциалов фагоцитов, которые обусловлены наличием pYP или pYV.

3. Субпопуляционный состав клеток крови белых мышей при экспериментальной чумной инфекции ассоциирован с плазмидным профилем чумного микроба. *Y. pestis* с полным набором плазмид оказывает существенное влияние на популяционный состав клеток крови экспериментальных животных, блокирует ключевые барьерные механизмы системы врожденного иммунитета (поглотительную способность фагоцитов и их бактерицидный потенциал), и препятствует формированию макроорганизмом полноценного адаптивного иммунитета.

### **Степень достоверности результатов и апробация работы**

О достоверности результатов работы свидетельствует достаточный объем исследований с применением современных, высокочувствительных методов с автоматизированной оценкой и учетом результатов, адекватных методов статистической обработки полученных данных.

Материалы, изложенные в диссертации, обсуждены и представлены на:

- Международных научных конференциях «Современные проблемы зоонозных болезней» (Улан-Батор, 2010-2013);
- Всероссийском Конгрессе по инфекционным болезням (Москва, 2012-2013); Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых «Фундаментальные и прикладные аспекты анализа риска здоровью населения» (Пермь, 2012); VIII Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых и специалистов Роспотребнадзора «Современные проблемы эпидемиологии и гигиены» (Московская обл., 2016); XI Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых и специалистов Роспотребнадзора «Современные проблемы эпидемиологии, микробиологии и гигиены» (Уфа, 2019);
- Межрегиональных научно-практических конференциях молодых ученых и специалистов «Человек: здоровье и экология» (Иркутск, 2010-2011); «Биологическая безопасность в современном мире» (Оболенск, 2009); «Актуальные проблемы профилактической медицины, среды обитания и здоровья населения» (Уфа, 2013);
- научных конференциях Иркутского противочумного института (2010-

2019).

В основу диссертационной работы положены исследования, проведенные в рамках трёх тем НИР института: «Особенности пато- и иммуногенеза экспериментальной чумной инфекции, вызванной *Y. pestis* с разным плазмидным составом» с № ГР 01201068223 (2011-2015 гг.) и результатов исследований, выполненных в рамках Отраслевой научно-исследовательской программы «Научные исследования и разработки с целью обеспечения санитарно-эпидемиологического благополучия и снижения инфекционной заболеваемости в Российской Федерации» (2011-2015 гг.) и Отраслевой научно-исследовательской программы «Проблемно-ориентированные научные исследования в области эпидемиологического надзора за инфекционными и паразитарными болезнями» (2016-2020 гг.) п. 6.3.2. «Исследование неизвестных ранее аспектов иммуногенеза и патогенеза при опасных инфекционных болезнях с целью совершенствования лечебных и профилактических мероприятий» (2016-2020 гг.).

### **Публикации**

По теме диссертации опубликовано 15 научных работ, из которых 7 – в рецензируемых научных журналах и изданиях, определенных ВАК Минобрнауки России и 2 – в ведущих рецензируемых изданиях, индексируемых в международных базах данных Web of Science и Scopus.

### **Личный вклад соискателя**

Автор непосредственно участвовал в проведении экспериментов, обобщении и анализе полученных результатов. В работах, выполненных в соавторстве, вклад автора является определяющим и заключается в непосредственном участии на всех этапах исследования: от постановки задач, их экспериментально-теоретической реализации до обсуждения результатов в научных публикациях и докладах.

### **Объем и структура работы**

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, двух глав собственных исследований, заключения, выводов и спи-

ска литературных источников. Работа изложена на 139 страницах машинописного текста, иллюстрирована 7 таблицами и 20 рисунками. Список литературных источников содержит 230 наименований, в том числе 83 – зарубежных.

## ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### ГЛАВА 1 СОВРЕМЕННОЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЕ О МОЛЕКУЛЯРНЫХ МЕХАНИЗМАХ ДЕЙСТВИЯ ФАКТОРОВ ВИРУЛЕНТНОСТИ *YERSINIA PESTIS*

Существование активных природных очагов чумы на территории России, возможность завоза инфекции с расширением транспортных связей и ростом миграции населения, а также угроза применения возбудителя в террористических целях способны привести к эпидосложнениям чрезвычайного характера [42, 43, 44, 58, 67, 129].

Возрастающая актуальность проблемы особо опасных инфекционных болезней в современных условиях определяется динамичным характером естественных и антропогенно детерминированных природных процессов, изменением нозологической структуры и нозологического профиля инфекционных болезней, ростом международных связей и совершенствованием мер противодействия их глобализации [16, 28, 220].

На территории Сибирского федерального округа находится три природных очага чумы: Горно-Алтайский, Тувинский и Забайкальский. В последние годы наблюдается значительное увеличение эпизоотической активности и эпидемического потенциала Горно-Алтайского высокогорного очага, связанного с проникновением чумного микроба основного подвида с приграничной территории Сайлюгемского природного очага Монголии [14, 35, 58, 91, 103].

В Горно-Алтайском высокогорном пригородном очаге чуме на протяжении трех лет (2014-2016 гг.) на фоне обострения эпизоотической активности стали регистрироваться эпидемические осложнения [14, 15, 35, 43, 44, 58, 91]. Это обусловило необходимость проведения иммунологического мониторинга на данной территории для совершенствования тактики применения мероприятий по специфической профилактике [95, 96].

Известно, что возбудитель чумы, циркулирующий на территории природных очагов Сибири, отличается по плазмидному составу, питательным потребностям, ферментативной активности и вирулентности для различных видов диких и лабораторных животных [1, 18, 38, 39, 129]. Так, имеются сведения о различиях биохимических свойств штаммов алтайского и основного подвидов [8, 18, 112, 129].

подавляющее большинство факторов вирулентности *Y. pestis* связаны с плазмидным составом. Геном возбудителя чумы основного подвида – *Yersinia pestis subspecies pestis* имеет три плазмиды – рYV (45мДа), рYP (6мДа) и рYT (61мДа), их роль хорошо изучена в реализации патогенных свойств иерсиний. С наличием плазмиды рYV штаммы иерсиний проявляют фенотипические признаки, связанные с вирулентностью: клеточную адгезию, аутоагглютинацию, поверхностную агглютинацию, а также синтез белков наружной мембраны, в том числе V- и W-антигенов и других белков, действие которых направлено на подавление фагоцитарной активности клеток иммунной системы. Плазмиды рYP и рYT видоспецифичны. Плазмида рYP детерминирует синтез бактериоцина-пестицина 1 и активатора плазминогена, а плазмида рYT кодирует два наиболее хорошо изученных фактора вирулентности – мышинный токсин и капсульный антиген F1 [9, 22, 23, 140, 161]. Отличительным признаком чумного микроба, циркулирующего в Тувинском очаге, является наличие в его геноме дополнительной четвертой плазмиды рTP33 [4, 12, 129, 152]. Предполагают, что данная плазмида представляет собой генетически модифицированный вариант резидентной плазмиды 9,5 кД, несущей гены *pla* (активатор плазминогена) и *pstI* (пестицин 1) [19]. Высказано предположение, что она является кольцевым геномом фага, который содержит гены фагового морфогенеза, а также гены двухкомпонентной системы белков токсин-антитоксин YoeB/YefM, действующей на репликативный аппарат бактерий, а также, что она играет роль в процессе колонизации преджелудка блох, обеспечивая большую прочность экзополисахаридного матрикса биопленки [4, 125]. 25-ти локусный VNTR-анализ показал полиморфизм возбудителя чумы как по отдельным мезоочагам, так и по локальным эпизоотическим участкам [4, 35].



Утрата плазмид приводит к изменению культуральных свойств, а также к снижению или полной утрате вирулентности возбудителя [5, 6, 22, 140]. Показано, что отсутствие рУР и рУV у штамма *Y. pestis* 231 не приводит к снижению эффективности формирования «чумного блока» в преджелудке блохи. Мутанты, лишенные рУТ, с низкой частотой вызвали образование блока в преджелудке блохи, что по-видимому, связано с их сниженной выживаемостью в пищеварительном тракте переносчика из-за отсутствия фосфолипазы Д, кодируемой геном *umt*, локализованном на этой плазмиде [11, 84, 196].

Как известно, центральным звеном в патогенезе чумы является способность возбудителя к быстрому распространению и размножению в макроорганизме. Степень развивающихся в нем патологических изменений проявляется в зависимости от вирулентности заражающего штамма возбудителя [5, 6, 51, 133, 172].

подавляющее большинство факторов вирулентности *Y. pestis* детерминировано плазмидными генами [5, 6, 20].

Геном возбудителя чумы алтайского подвида *Y. pestis* subsp. *altaica* также представлен тремя плазмидами: рУV, рУР и рУТ. И их роль в реализации патогенных свойств иерсиний хорошо изучена. В частности, с наличием плазмиды рУV штаммы иерсиний проявляют фенотипические признаки, действие которых направлено на подавление фагоцитарной активности клеток иммунной системы. Видоспецифическая плазида рУР детерминирует синтез бактериоцина (пестицин 1) и активатора плазминогена, а плазида рУТ – мышинового токсина и F1 капсулы [5, 6, 12, 22, 25, 115, 141].

Утрата одной или нескольких плазмид приводит к изменению патогенных свойств и к снижению или даже полной утрате вирулентности возбудителя, а также соответственно влияет на морфофункциональное состояние органов иммунной системы [25].

При чумной инфекции и интоксикации ведущим клиническим признаком, определяющим тяжесть течения и исход заболевания, является нарушение гомеостаза макроорганизма. Первичными мишенями для эндотоксина являются полиморфноядерные лейкоциты, макрофаги, моноциты, клетки эндотелия и другие

клеточные элементы. Как известно, изменение клеточного состава перитонеальной жидкости можно расценивать как диагностический критерий тяжести болезни при многих инфекционных заболеваниях [40, 41, 57, 127], в том числе и при чуме.

Важным условием патогенности и адаптивной пластичности микроорганизмов является их способность к противодействию иммунной системе макроорганизма. Последнее время существенно возрос интерес к факторам вирулентности, обуславливающим устойчивость патогенов к различным механизмам иммунитета. Сведения о молекулах, системах и органеллах патогенных микроорганизмов, позволяющих им противостоять врожденному и адаптивному иммунитету макроорганизма, могут послужить основой для разработки методов лечения и профилактики инфекционных заболеваний [29]. Ф.Ю. Гариб классифицировал основные приспособительные «стратегии» противодействия патогенов самой древней защитной системе макроорганизма – врожденному иммунитету. К ним относятся: «ускользание» бактерий от иммунного распознавания, препятствие захвата фагоцитирующими клетками и устойчивость к их системам «киллинга» (низкий рН, синтез токсичных радикалов кислорода и азота, продукция антимикробных пептидов, дефицит железа и пр.).

Возбудители особо опасных инфекций, безусловно, являются наиболее приоритетным объектом для изучения факторов противодействия иммунной системе макроорганизма, поскольку они обладают наиболее разнообразными и эффективными приспособительными механизмами, позволяющими им циркулировать в природных очагах и выживать в организме млекопитающих [6, 39, 132]. Традиционной моделью для изучения взаимоотношений бактериальных патогенов с хозяином и переносчиком является возбудитель чумы – *Y. pestis*. Для успешной циркуляции возбудителя в природных очагах необходимо наличие полного спектра генетических детерминант, определяющих его адаптивный потенциал [5, 6, 7, 66, 152] при заболеваниях, вызванных патогенными бактериями в отличие от вирусных инфекций, организм хозяина подвергается воздействию не самих генетических структур возбудителя, а кодируемых ими продуктов, экспрессия которых зависит от наличия в организме хозяина необходимых для этого условий. Боль-

шой вклад в адаптивный потенциал *Y. pestis* вносят секретируемые возбудителем протеолитические и антиоксидантные ферменты. Основной мишенью для протеолитических ферментов бактерий являются сигнальные и эффекторные молекулы иммунной защиты. Например, протеазу Pla чумного микроба рассматривают в качестве основного фактора, опосредованно влияющего на генерализацию инфекционного процесса (в результате лизиса фибриновых сгустков, препятствующих распространению патогена) [5, 6]. Благодаря супероксиддисмутазам (СОД) и каталазам патоген утилизирует супероксиданион и перекись водорода, которые образуются в результате респираторного взрыва при фагоцитозе [62].

Генетические структуры, определяющие патогенный потенциал чумного микроба, так же как его биохимическая активность изучены не в полной мере. Полагают, что детерминанты метаболитов, которые опосредуют способность возбудителя преодолевать иммунные барьеры макроорганизма, могут быть локализованы как на хромосоме, так и на плаزمиде [68]. Тем не менее, основную роль в формировании патогенного потенциала *Y. pestis* играют плазмиды, поскольку значительная доля факторов патогенности и регуляторных систем, координирующих их экспрессию, находится под контролем генов, локализованных на плаزمиде рYV, рYP и рYT [39].

Косвенные указания на наличие собственных плазмид у чумного микроба были получены Е.Г. Кольцовой в 1970, которой впервые удалась передача кишечной палочке плазмиды пестициногенности от чумного микроба [39, 56].

рYP (pPst) – (9,5 т.п.н.) – видоспецифичная плазида патогенности. Показано, что молекулярная масса плазмиды пестициногенности, определенная независимыми методами составляет около 6Md, плавучая плотность плазмидной ДНК в растворах хлористого цезия равна 1,7085-1,7095 г/см, суммарное содержание гуанина и цитозина составляет 49-50 %. Количество копий плазмиды пестициногенности в расчете на один хромосомный эквивалент составляет 13-16 без амплификации и 200-230 в присутствии ингибитора белкового синтеза хлорамфеникола [77].

В 2010 году С. Rajanna с соавт. определили полные последовательности рYP

от трех штаммов *Y. pestis* из бывшего Советского Союза (БСС) и сравнил с рУР трех хорошо ранее охарактеризованных штаммов *Y. pestis* (KIM, CO92, и 91001) [155]. Две плазмиды были получены от штаммов C2614 и C2944, изолированных из очагов чумы в России, и одна плазида получена от штамма C790 из Кыргызстана. Секвенированием идентифицировали четыре типа последовательностей из числа этих шести плазмид. рУР в штаммах БСС была наиболее генетически связана с рУР штамма KIM и наименее связана с рУР плазмидой у *Y. pestis* 91001. В общем, у штаммов БСС было обнаружено наибольшее число копий плазмиды Pst по сравнению со штаммом CO92. Экспрессия плазмидного гена Pla у штамма C2944 была значительно ( $P \leq 0,5$ ) выше, чем у штамма CO92. Учитывая роль Pla в вирулентности *Y. pestis*, это различие может иметь важное значение для вирулентности штаммов [155, 213].

рУТ (pFra) – (60-90 т.п.н.) – плазида токсигенности. Как и рУР, рУТ не является основным детерминантом вирулентности, несмотря на её роль в синтезе токсинов. Несет гены, определяющие синтез «мышинного» токсина (сложный белок, состоящий из двух фрагментов А и В), и гены, контролирующие белковый и липопротеиновый компоненты капсулы. Третий ее компонент контролирует гены хромосомы. На рУТ также локализованы гены, ответственные за синтез FI – капсульного антигена, который является одним из «классических» факторов патогенности *Y. pestis*. В 1996 году А.Ю. Гончаров представил результаты исследования структурно-функциональной организации участка ДНК плазмиды Fra, ответственного за синтез FI чумного микроба. Было установлено наличие у плазмиды двух участков ДНК, влияющих на экспрессию FI. Один из них расположен в области BglII-BglIII фрагмента и вызывает репрессию синтеза FI, другой участок регулирует термозависимый характер синтеза FI. Его удаление делает возможным синтез FI в клетках *Y. pestis* при температуре роста 28 °C [34, 141].

Исследователи считают, что рУР и рУТ являются основными «приобретениями» чумного микроба [5, 6].

рУV (pCad) – (65-75 т.п.н.) – родоспецифичная плазида вирулентности. Благодаря плазмиде вирулентности у штаммов *Y. pestis* и других патогенных иер-

синий проявляются следующие фенотипические признаки: клеточная адгезия, аутоагглютинация, поверхностная агглютинация; зависимость роста от концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  в среде культивирования; синтез белков наружной мембраны: V- и W-антигенов; высвобождение белков в среду культивирования; повышенную гидрофобность клеточной поверхности; летальность мышей при заражении патогенными иерсиниями [140].

Очевидно, что способность противостоять защитным механизмам врожденного иммунитета хозяина в коже определяет дальнейшую судьбу инфекционного процесса. Различия в сроках гибели животных при экспериментальной чуме определяются продолжительностью именно кожного этапа инфекционного процесса, на котором происходит размножение бактерий [171]. Размножаются ли бактерии на этом этапе внутри тканевых фагоцитов или внеклеточные бактерии также способны к размножению в коже не установлено. Резистентность к действию гуморальных факторов врожденного иммунитета хозяина необходима для выживания *Y. pestis* на первом этапе инфекции.

Возбудитель чумы обладает разной резистентностью к клеточным факторам врожденного иммунитета, причем бактерии, выделенные из блох, обладают большей резистентностью к фагоцитозу, чем бактерии, выращенные *in vitro* [215]. Попадая в кожу, бактерии привлекают к себе нейтрофилы, дендритные клетки и резидентные тканевые макрофаги [205, 225]. При этом бактерии не взаимодействуют с дендритными клетками, но активно поглощаются нейтрофилами и макрофагами.

Имеются сведения о том, что *Y. pestis* может не только выживать, но даже размножаться в нейтрофилах, бактерицидному действию которых микроб способен сопротивляться. Для этого бактериям важно иметь модифицированный 4-аминоарабинозой ЛПС [227], что необходимо для защиты бактерий от бактерицидного действия катионных пептидов нейтрофилов. Выжившие в нейтрофилах бактерии могут использовать их как временную нишу, обеспечивающую возможность микробам попасть в макрофаги путем эффероцитоза нейтрофилов [226]. Макрофаги являются репликативной нишей *Y. pestis*, поэтому на первом этапе

инфекции бактериям важно попасть не в нейтрофилы, а в макрофаги. В прикреплении бактерий к макрофагам важную роль играют два синтезируемых микробом поверхностных белка – Pla и Ail [180].

У иерсиний известно несколько белков, обеспечивающих прикрепление патогена к мембране эукариотических клеток: адгезин YadA, инвазин, белок Ail и рН 6 антиген. рН 6 антиген является общим для двух видов *Yersinia* поверхностным белком, синтезирующимся в виде субъединиц с молекулярной массой 15 кДа, которые затем агрегируют с образованием макромолекулярной капсулы.

И.В. Бахтеева показала, что рН 6 антиген не является обязательным фактором патогенности *Y. pestis* [17]. Утрата способности к его продукции не приводит к снижению вирулентности возбудителя чумы, но его присутствие дает селективные преимущества PsaA<sup>+</sup> бактериям в организме теплокровного хозяина на ранних стадиях инфекции. Большинство присущих белку PsaA биологических эффектов определяется именно его адгезивной активностью. В зависимости от концентрации PsaA либо стимулирует дифференцировку и адгезию макрофагов, либо вызывает их аутоагглютинацию. Отсутствие протективности рН 6 антигена не связано с его синтезом внутри фаголизосом и некротических очагов и недоступностью для антител и иммунокомпетентных клеток. Отсутствие протективности PsaA в совокупности с феноменом селекции PsaA<sup>+</sup> бактерий в организме теплокровного хозяина объясняют факт выделения в природных очагах чумы только PsaA<sup>+</sup> штаммов *Y. pestis*, что позволяет рассматривать PsaA или кодирующие его гены как перспективную мишень для лабораторной диагностики [17].

Основным адгезином возбудителя чумы считается протеаза Pla, необходимая для взаимодействия бактерий с лектиновым рецептором DEC-205 на поверхности макрофагов [210]. Механизм участия протеазы в адгезии к клеткам хозяина оставался неизвестным, пока не выяснили, что Pla осуществляет посттрансляционный процессинг белка-аутопереносчика YapE, что приводит к появлению у последнего адгезивных свойств [184]. Поэтому можно предположить, что протеаза играет опосредованную роль в адгезии к макрофагам. Не менее важным адгезином является и белок Ail, у которого выявлена способность связывать *in*

*vitro* эпителиальные клетки и моноциты [180].

Способности *Y. pestis* выживать внутри фагоцитов и активно пролиферировать способствуют белки внешней мембраны (Yops), кодируемые pYV, шесть из них являются эффекторными (Yop E, Yop H, Yop M, Yop P, Yop T, Yop O), поскольку их действие направлено на подавление фагоцитарной активности иммунной системы макроорганизма. Большинство из них синтезируется бактериями чумы в условиях, имитирующих фаголизосому *in vitro* [104, 148].

На основании наличия и разницы в размерах трех классических (pYT, pYV и pYT), а также криптических плазмид удается различать не менее 20 плазмидоваров *Y. pestis*. Один из них включает практически все штаммы биовара *Orientalis*, другие характерны для определенных природных очагов, а некоторые плазмидовары представлены единичными уникальными штаммами [78, 105].

Макрофаги являются профессиональными фагоцитами, основными для природного иммунитета, их ролью является разрушение чужеродных объектов в теле [29, 48, 182]. Эти фагоциты находятся почти во всех тканях организма, имеющие особенно значительные популяции во вторичных лимфоидных органах, а также в высоко подверженных для посторонних частиц тканях, таких как легкие и желудочно-кишечный тракт. В дополнение к их роли в природном иммунитете, макрофаги также играют роль в адаптивном иммунитете в продуцировании цитокинов и представлении антигенов лимфоцитам, стимулируя продукцию антител [128, 130, 182]. Установлено, что перитонеальные макрофаги обладают гораздо большей скоростью хемотаксиса на начальном этапе фагоцитоза, по сравнению с ПЯЛ и особенно – альвеолярными макрофагами [40].

Макрофаг способен распознавать патогенный объект, используя различные внешние клеточные рецепторы, которые инициируют фагоцитоз данного патогена [130, 137, 138, 182]. Когда макрофаг взаимодействует с патогеном и разрушает его, например, посредством распознавания бактериальных лигандов с помощью Toll-подобных рецепторов, макрофаг может затем обработать антиген и представить его CD4 Т-клеткам [182]. Т-клетки тогда продуцируют INF- $\gamma$ , который активирует макрофаги [138, 147]. Заключение макрофагальной активности является

окислительный взрыв, который возникает в результате продукции реактогенных кислородных радикалов. Эти реактогенные кислородные разновидности могут активировать фактор транскрипции, приводящий к регуляции провоспалительных цитокинов; в дополнение, эти кислородные интермедиаты являются высоко бактерицидными [97, 182].

В 2002 году Г.И. Васильева с соавт. показала, что монокины, продуцируемые под воздействием микробных клеток вакцинного штамма чумного микроба, в отношении функциональной активности нейтрофилов оказывают хелперный эффект, существенно усиливая киллерную и хемотаксическую способности нейтрофилов, экспрессию Рс-рецепторов и способствуют лабильности лизосомных мембран этих клеток. Причем данный эффект более выражен при вторичном иммунном ответе, чем при первичном [23].

В.И. Дубровина при исследовании бактерицидного механизма фагоцитоза чумного микроба макрофагами морских свинок установила участие монооксида азота [40].

Инфекционный процесс при чуме – это результат сложного взаимодействия патогена и организма хозяина. Чтобы противодействовать возбудителю чумы макроорганизму необходимо развертывание полноценного специфического гуморального и клеточного иммунного ответа, так как механизмы классического гуморального ответа могут противостоять внеклеточно представленному возбудителю, а для нейтрализации микроба внутри клетки необходима активация клеточного звена иммунной системы [50].

Помимо фагоцитоза важной частью защиты организма от инфекций является формирование внеклеточных ловушек. Описания таких механизмов антибактериальной защиты имеются в публикациях многих авторов [183, 188, 192]. К внеклеточным ловушкам относятся нейтрофильные NETs, MCETs тучных клеток, а также эозинофильные EETs [59, 60].

Экспериментальные исследования по установлению патогенных эффектов возбудителя и его токсинов на макроорганизм является актуальной проблемой патологической физиологии, поскольку большая часть патогенного потенциала



чумного микроба, циркулирующего в природных очагах, для людей остается неизвестной [2, 8]. Факторы патогенности чумного микроба приводят к гипоксии и, как следствие, изменению активности процессов перекисного окисления липидов [73].

Известно, что изначально чума является болезнью грызунов. Причем восприимчивость лабораторных мышей варьирует с возрастом. Так, после заражения *Y. pestis* KIM5 мышей линии В10.Т(6R) разных возрастных групп, было обнаружено, что молодые двухмесячные мыши имеют большое количество нейтрофилов в печени, а также более низкую летальность по сравнению со средневозрастными (5-6 месяцев) [203].

Кроме того, различия в сроках гибели животных при экспериментальной чуме определяются продолжительностью противостоять защитным механизмам врожденного иммунитета хозяина в коже. Это один из важных этапов, определяющий дальнейшую судьбу инфекционного процесса, на котором происходит размножение бактерий [171]. Вместе с тем, нет сведений о способах размножения чумного микроба в коже, т. е. происходит ли размножение бактерии внутри тканевых фагоцитов или внеклеточные бактерии также способны к размножению.

Возбудитель чумы обладает разной резистентностью к клеточным факторам врожденного иммунитета, причем бактерии, выделенные из блох, обладают большей резистентностью к фагоцитозу, чем бактерии, выращенные *in vitro* [216]. Попадая в кожу, бактерии привлекают к себе нейтрофилы, дендритные клетки и резидентные тканевые макрофаги [205, 225]. При этом бактерии не взаимодействуют с дендритными клетками, но активно поглощаются нейтрофилами и макрофагами.

Известно, что бактерии могут проникать в клетки эукариот, регулируя собственный фагоцитоз клеткой-хозяином. Природные механизмы инвазии бактерий делят на две группы: механизм «застежки-молнии» и триггерный механизм. Согласно первому механизму бактерии запускают необходимые для инвазии перестройки цитоскелета и мембраны, связываясь с рецепторами клетки-хозяина. Согласно второму – бактерии регулируют собственный фагоцитоз, впрыскивая в ци-

топлазму клетки-хозяина регуляторные белки [139]. *Y. pestis* выбирает второй. После заражения млекопитающего, изменения температурных условий к 37 °C провоцируют проявление у *Y. pestis* многих известных факторов патогенности, которые подавляют сопротивление врожденного иммунитета. Факторы вирулентности, транскрибированные от плазмид бактерий, перемещаются к клеткам – хозяевам. Они включают V токсин и белки Yops. Эти факторы не производятся в условиях низкой температуры в организме блохи [215]. Различия влияния условий в организме блохи и млекопитающих на факторы патогенности *Y. pestis* были изучены методом гель-электрофореза. Результаты исследований показали, что различия наблюдались для таких известных факторов патогенности, как пероксидаза каталазы (KatY), мышинный токсин (Ymt), активатор профибринолизина (Pla) и F1-капсульный антиген (Caf1), так же как и предполагаемые факторы патогенности (белки шапероны, сигнальные молекулы и т.д.) [151, 193, 211].

Поскольку в организме блох, имеющих температуру окружающей среды, микроб капсулу не образует то, следовательно, может захватываться лейкоцитами. Однако, как было доказано учёными лаборатории зоонозных патогенов и лаборатории горного Рокки (США), бактерии, изолированные из организма блохи, наиболее устойчивы к полимофнонуклеарным лейкоцитам хозяина, чем бактерии того же штамма, выращенные искусственно в бульоне при температуре 26 °C [206, 226, 228].

В организме млекопитающего не инкапсулированные бациллы фагоцитируются макрофагами, но оказываются защищенными от разрушения и гибели, в отличие от большинства других микроорганизмов.

Установлено, что чумной микроб в L-форме медленнее поглощается и оказывает меньшее повреждающее действие на фагоцит, но в большей мере стимулирует активность окислительных (глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы, НАДФ·Н-оксидазы) и гидролитических (лизоцима, катепсина, кислой фосфатазы) ферментов [40].

Чумные бактерии размножаются внутри макрофагов. После трех – пяти часов при 37 °C бациллы производят F1 капсульный белок. Эта выработанная кап-

сула предотвращает дальнейший фагоцитоз. Предположительно, вхождение чумного микроба в клетки осуществляется по «инициативе» самого микроба, путем так называемого «parasite-specified endocytosis» [39, 40, 131, 141]. Этот процесс не требует от микроба наличия специализированных органелл, но сопряжен с затратой энергии. Попадая внутрь клетки, чумной микроб, чтобы выжить, из двух возможных путей (высвобождение из фаголизосомы и приобретение резистентности к лизосомальным ферментам) выбирает второй. После размножения в клетках и выхода из них, он проникает в новые клетки. Таким образом, выживание внутри профессиональных фагоцитов является характерной особенностью вирулентных штаммов чумного микроба, отмеченной еще И.И. Мечниковым в 1903 году и подтвержденной Г.С. Кулешой в 1915. Устойчивые к фагоцитозу чумные микробы вызывают гибель лейкоцитов крови по типу позднего апоптоза – с длительной задержкой по времени, характерной для генерализации воспалительного процесса (сепсиса) [143]. Также широко обсуждается вопрос об «антифагоцитарных» свойствах этого микроорганизма [7, 39, 40, 133, 141].

Существует предположение, что фагоцитоз – это главный стимул для активации транскрипционного фактора NF-κB в ответ на инфицирование *Y. pestis*, и что вход микроба в макрофаги может вовлечь участие протеинкиназ, таких как PI3K и PKC [141, 151].

Несмотря на все сказанное, устойчивость чумного микроба к фагоцитозу не является абсолютной. Во-первых, даже в неиммунизированном организме фагоциты часто с ним «справляются». Во-вторых, как правило, эффективность фагоцитоза существенно возрастает по мере развития иммунитета. Для того чтобы понять причину этого надо вспомнить некоторые особенности клеточного иммунитета, присущего, в частности, и чуме. Установлено, что свойства макрофагов варьируют в зависимости от вида и линии животных, от их локализации в данном организме и даже внутри одной и той же ткани; субпопуляции макрофагов существенно различаются по своей морфологии, размерам, фагоцитарной способности, экспрессии на поверхности Fc- и C3-рецепторов, антигенов Ia и дифференциации их по иммунорегуляторной активности [53, 142]. Естественно поэтому, что в ор-

организме человека чумной микроб сталкивается с такой же ситуацией.

Фактически, у *Y. pestis* есть несколько факторов вирулентности: прикрепление к клеткам – хозяевам происходит через *YadA* «адгезин». *YopJ* ингибирует активацию макрофага и производство провоспалительного цитокина. *YopH* ингибиторы разрушают цитоскелет макрофага и также ингибируют фагоцитоз. После заражения макрофага, вскоре следует его некроз [187, 226].

Что касается дополнительных факторов защиты от иммунитета хозяина, то к ним относятся ген *otrA* – ген провыживания [208, 209]. Также дополнительным фактором защиты является ингибитор лизоцина *Ivy* [173].

После выхода из макрофагов бактерии распространяются к региональным лимфатическим узлам, в которых они продолжают активно размножаться, вызывая их увеличение и воспаление [168, 150]. В месте с тем показано, что торможению миграции в лимфоузлы нейтрофилов способствует белок-эффектор, *YopJ*, который подавляет синтез IL-8, стимулирующего активацию нейтрофилов [197, 226].

Известно, что при инфекционном процессе, вызванном *Y. pestis* в результате размножения и разрушения макрофагов бактерии из лимфоузла попадают в кровь и с белков наружной мембраны *Ail* и *Pla* выживают в крови. Недавние исследования показали, что связывание компонента C3/iC3b комплемента белком *Ail* на поверхности бактерий способствует их адгезии к нейтрофилам [229], что и определяет выбор бактериями нейтрофилов, на поверхности которых присутствует рецептор комплемента CR3, как основной мишени для инъекции эффекторов T3SS в селезенке.

Липид А играет важную роль в снижении воспалительного ответа, поскольку изменение его структуры при 37 °C (преобладание тетра-ацилированной формы) приводит к ингибированию взаимодействия с рецепторным комплексом TLR4/MD2 [55].

Отсутствие инфильтрации провоспалительных клеток в печени и селезенке (активированных макрофагов, дендритных клеток, NK-клеток) также может быть связано с действием белка *YopM*, который способен попадать в фагоциты как с

помощью T3SS, так и самостоятельно. YopM подавляет миграцию провоспалительных дендритных клеток в селезенку, а в печени вызывает апоптоз нейтрофилов и макрофагов [153]. Одной из мишеней действия YopM является цистеиновая протеаза каспаза-1, инактивация которой препятствует созреванию инфламмосомы и освобождению провоспалительных цитокинов IL-1 $\beta$  и IL-18. Кроме того, установлено, что белки YopM и YopJ подавляют экспрессию этих цитокинов [187, 197].

Показано, что чумной микроб способен также проникать внутрь эритроцитов и утилизировать из гемоглобина ионы железа. Вместе с тем было установлено, что эритроциты человека и высокочувствительных к заражению возбудителем чумы животных (белая крыса, белая мышь, морская свинка, кролик, свинья) обладают высокой бактериофиксирующей способностью, а эритроциты мало чувствительных к инфицированию возбудителем чумы животных (лошадь, кошка) фиксируют на своей поверхности клетки *Y. pestis* EV в значительно меньшей степени [141].

Существуют данные о возможности проникновения возбудителя чумы в эпителиальные клетки [175]. Установлена способность некоторых внутриклеточных бактерий, в том числе и *Y. pestis* проявлять патогенные свойства и вне клетки, тем самым вызывая двойной вариант инфекции: внутриклеточную и внеклеточную [180].

F. Guinet соавт. показал, что исключительная вирулентность *Y. pestis* также обусловлена способностью чумного микроба массивно инфильтрировать дренирующий лимфатический узел (DLN), не вызывая в этом органе ответную реакцию полиморфноядерных клеток [158].

Известно, что для реализации патогенных свойств в организме восприимчивого хозяина возбудителю чумы необходим целый набор факторов патогенности, обеспечивающих их координированную экспрессию. Особенность вариативности структуры ЛПС *Y. pestis* является его защитным механизмом, препятствующим распознаванию иммунной системой. Так, С.В. Дентовская показала, что *ΔlpxM* вариант высоковирулентного штамма *Y. pestis*, способного вызвать клини-

чески выраженное заболевание при инокуляции малого числа бактериальных клеток, может индуцировать эндотоксический шок, несмотря на образование менее токсичных форм ЛПС, в то время как менее вирулентные бактерии для проявления этой активности нуждаются в синтезе высокотоксичных форм ЛПС. Установлено, что *lpxM* мутация приводит к снижению остаточной вирулентности аттенуированных штаммов *Y. pestis*, но не снижает вирулентность штамма *Y. pestis* 231 дикого типа. Кроме того показано, что *lpxM* мутанты вакцинного штамма EV проявляют повышенную протективную активность и низкую реактогенность по сравнению с исходным штаммом [37, 204].

Показана роль ЛПС в реализации патогенных свойств *Y. pestis*. Так, укорочение кора в ЛПС-мутантах значительно уменьшает устойчивость бактерий к фагоцитам, снижает ферментативную активность активатора плазминогена, что приводит к снижению вирулентности ЛПС-мутантов для мышей и морских свинок. Гены *waaC*, *hldE* и *waaA* или кодируемые ими белки, ответственные за синтез внутренней области кора ЛПС, являются перспективными мишенями для поиска ингибиторов вирулентности *Y. pestis* [37].

Известно, что ЛПС является важным компонентом наружной мембраны у грамотрицательных бактерий и лигандом для TLR4 [149]. Экспрессия и формирование ЛПС у *Y. pestis* может соответственно изменить другие хост-специфические условия, а также *Y. pestis* полностью содержать смесь стимулирующего и нестимулирующего ЛПС, особенно в переходный период между температурами блохи и основного хозяина. При переходе температуры от блошиной (26 °C) к температуре млекопитающего (37 °C), *Y. pestis* немедленно начинает вырабатывать тетраацилированный ЛПС, который является нестимулирующим для TLR4, а также антагонистом для стимуляции гекса-ациллированных форм ЛПС. Таким образом, *Y. pestis* может успешно блокировать активность макрофагов и секрецию провоспалительных цитокинов, которые по очереди предотвращают дальнейшую активацию и созревание дендритных клеток, необходимых для индуцирования адаптивного иммунного ответа [149].

Ранее многие ученые предполагали, что основной причиной гибели хозяина

является выброс большого количества провоспалительных цитокинов в ответ на продукты разрушения клеток хозяина. В настоящее время причиной гибели животных на терминальной фазе инфекционного процесса считается развитие инфекционно-токсического шока, в реализации которого, несомненно, принимают участие и продукты *Y. pestis*. Общеизвестно, что основным токсическим компонентом возбудителя чумы является ЛПС, однако механизм токсического действия ЛПС на терминальной фазе инфекции исследован слабо. Известно, что при температуре тела животных 37 °С ЛПС чумного микроба синтезируется в тетра- и триацилированной форме, обладающей слабой цитокининдуцирующей активностью. На модели ряда энтеробактерий показано, что компонент наружной мембраны, липопротеин брауна (Lpp), обладает синергичным действием с ЛПС при индукции септического шока. О возможном сходном действии этих молекул при чуме свидетельствуют результаты анализа двойных мутантов *Y. pestis*, не синтезирующих Lpp и MsbB, ацилтрансферазу, катализирующую присоединение к ЛПС лауриновой кислоты. Такие двойные мутанты на поздних этапах инфекции (72 ч) индуцировали гораздо меньше провоспалительных цитокинов, чем одиночные мутанты и родительские штаммы [159]. Механизм этого явления пока не ясен. Известно, что снижение при 37 °С количества и/или активности синтезируемого *Y. pestis* MsbB способствует синтезу бактериями малотоксичного гипоацилированного ЛПС, обладающего слабой цитокининдуцирующей активностью. Вопрос о том, может ли продукция MsbB активироваться в животных на терминальной стадии инфекции и приводить к синтезу гексаацилированного ЛПС, стимулирующего продукцию провоспалительных цитокинов, нуждается в дальнейшем изучении. Возможный механизм, который позволяет лпс из малотоксичной формы, синтезируемой бактериями при 37 °С, переходить в высокотоксичную форму продемонстрирован в ряде работ [122]. В модельных экспериментах с ЛПС, выделенным из выращенных при 37 °С бактерий, установлено, что этот переход связан с изменением конформации ЛПС, которое может происходить как под влиянием гликолипида, имеющегося в селезенке, печени и эритроцитах животных, так и при взаимодействии ЛПС с синтезируемым бактериями мышинным

токсином Ymt. Предполагается, что такая активация ЛПС, приводящая к интенсивному синтезу провоспалительных цитокинов, может иметь место на терминальной фазе инфекционного процесса и вызывать токсический шок и гибель животных. Могут ли в процессе активации ЛПС принимать участие и другие компоненты *Y. pestis* (например Ail, Pla), которые связаны с ЛПС в клеточной стенке бактерий, пока неизвестно. На терминальной фазе инфекции, близкой к гибели животного, септицимия приводит к распространению бактерий по всем органам. Так, у павших животных бактерии присутствуют не только в лимфоузлах, печени и селезенке, но и в тех органах, где их не было на предыдущих стадиях (кишечник, легкие, почки) развития бубонной формы чумы [171]. Таким образом, высокая способность бактерий распространяться по лимфатическим узлам способствует быстрому развитию инфекции, приводящему к смертельной септицемии – инфекционно-токсическому шоку.

Адаптивный иммунный ответ основан на отборе и усилении клонирования Т- и В-клеток, которые распознают и выводят из строя патоген-ассоциированные антигены и гарантируют антигенспецифическую и долговременную иммунную память. Активация Т- и В-лимфоцитов не только зависит от TCR-МНС/пептидного взаимодействия, но также от стимуляции костимуляторных молекул и секреции цитокинов/хемокинов клетками врожденной иммунной системы [93, 149, 199, 201]. *Y. pestis* способен уменьшить адаптивный иммунный ответ хозяина с помощью регуляции активации цитокинов действуя непосредственно с помощью Yops на иммунные клетки, вовлеченные в адаптивный иммунный ответ. Таким образом, инактивация Т-клеток приводит к снижению секреции IFN- $\gamma$  и TNF- $\alpha$ , влияющих на активность врожденного иммунитета [149, 154].

В.В. Фирстовой с соавт. научно обосновано и подтверждено в экспериментах на животных, что способность лимфоцитов изменять экспрессию поверхностных маркеров и активность синтеза цитокинов под влиянием антигенов *Y. pestis in vitro* отражает наличие специфического клеточного иммунитета, достаточного для защиты от заражения чумой [89]. Так, I. Lin с соавторами (2011) показали, что IL-17 играет определенную роль в защите хозяина, которая усиливает защиту от ле-



гочного заражения *Y. pestis*. Кроме того, в своих исследованиях сделали заключение, что вакцины против легочной чумы должны быть направлены на индукцию смешанных клеточных ответов типа 1 и типа 17 [170]. Также было показано, что геном чумного микроба в макрофагах приобретает волокнистую структуру, способствующую предотвращению прохождения поврежденных геномных копий к дочерним клеткам, увеличивая период времени для восстановления ДНК, а также подавляет некоторые антибактериальные механизмы защиты хозяина [164].

Как указывалось выше, чумной микроб поражает макрофаги крови путем проникновения внутрь. Однако возможность, скорость и механизм проникновения, а также само влияние микроба на макрофаг может различаться в зависимости от индивидуальных особенностей штамма.

При исследовании фагоцитоза рекомбинантных штаммов *Yersinia pseudotuberculosis* (с разной способностью продуцировать капсульный антиген F1 возбудителя чумы) перитонеальными макрофагами морских свинок установлено, что включение в клетки *Y. pseudotuberculosis* fra-оперона чумного микроба, ответственного за синтез капсульного антигена, существенно влияет на механизмы фагоцитоза. Наличие у *Y. pseudotuberculosis* капсулы является ингибирующим признаком в отношении фагоцитарной активности (процесс захвата) перитонеальных макрофагов как интактных, так и иммунизированных чумной живой вакциной EV животных. Специфическая иммунизация животных приводит к интенсификации захвата макрофагами псевдотуберкулёзных микробов, в большей степени в случае применения штаммов лишенных fra-оперона *Y. pestis*. Также множество работ посвящено изучению свойств штаммов *Y. pestis*, имеющих различный генетический состав [31, 45, 52, 63, 71, 90, 209].

Секвенирование генов LcrV и сравнение аминокислотных последовательностей десяти штаммов *Y. pestis*, принадлежащих в основном к группе атипичных рамнопозитивных изолятов, выявило полиморфизм аминокислотных последовательностях LcrV по сравнению с эталонным штаммом *Y. pestis* CO92. Одним из возможных объяснений этому может быть результат адаптации возбудителя чумы к различным хозяевам грызунов и лагоморфам [217, 218].

Как показали многолетние исследования чумного микроба, наиболее важный протективный антигенный материал (липополисахариды, белки наружной мембраны, пептидогликан и другие PAMPs) находится в поверхностных структурах бактериальной клетки грамотрицательных бактерий (капсула, S-слои, наружные мембраны, клеточные стенки и оболочки бактериальной клетки в целом), они играют ведущую роль во взаимодействии микроба с макроорганизмом [21].

На протяжении последнего десятилетия наблюдался значительный прогресс в понимании молекулярных механизмов, лежащих в основе активации врожденного иммунитета. Показано, что при чумной инфекции TLR9 является наиболее важным среди других TLR в активации иммунной системы хозяина. Выявление рецепторов хозяина, которые распознают патоген-производные нуклеиновые кислоты показало их важную роль в запуске иммунитета к внутриклеточным патогенам, вовлеченных в активацию врожденного иммунитета хозяина [190, 202, 219].

Установлено, что бактериальная ДНК, в том числе и чумного микроба, является патоген-ассоциированной молекулярной структурой (PAMPs), которая способствует инициированию каскада реакций, приводящих к синтезу провоспалительных цитокинов иммунокомпетентными клетками и активации механизмов иммунологической защиты организма [107, 174, 176, 195].

При этом функциональная способность фагоцитов, примированных антигенным препаратом на основе клеточных оболочек и F1 чумного микроба, проявляется в повышении степени активации эффекторных функций клеток иммунофагоцитарной системы (микробицидность, продукция супероксидных и нитроксидных радикалов), которая модулируется за счет применения тДНК *Y. pestis* EV НИИЭГ [107]. С помощью разработанного П.Н. Дегтяревым с соавт. реагента для выявления лимфоцитов с рецепторами (ЛфР) к F1 антигену *Y. pestis* установлено наличие этих клеток в периферической крови всех кроликов и людей, иммунизированных вакциной EV. Показано, что при повторной вакцинации людей ЛфР появлялись и исчезали раньше, чем при первичной вакцинации [111].

Исследование врожденного иммунного ответа, возникающего у мышей при

введении штамма *Y. pestis*, лишённого рYV свидетельствует о том, что важной особенностью чумной инфекции является сниженная активация клеток иммунофагоцитарной системы и формирование воспалительной реакции, которая, по крайней мере, частично зависит от плазмиды патогенности [181].

Таким образом, сравнительное изучение фагоцитоза чумного микроба с разным плазмидным спектром помимо научного интереса в раскрытии механизмов и особенностей этого процесса, будет способствовать пониманию патогенеза чумы и, возможно, экспериментальному обоснованию факторов, обеспечивающих резистентность патогена к системам врожденного иммунитета хозяина.

## ГЛАВА 2 МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### 2.1 Экспериментальные животные

Экспериментальными моделями в опытах (заражение, отбор проб крови, получение фагоцитов и т.д.) служили морские свинки массой 200-250 г и белые беспородные мыши массой 18-20 г обоих полов. В работе использовались здоровые животные, полученные из питомника ФКУЗ Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора (РД 42-26-3...3738, НПО «Вектор», Новосибирск). Биомодели содержались на стандартном рационе с достаточным количеством воды, в соответствии с требованиями по гуманному содержанию и использованию животных в экспериментальных исследованиях. Всего в опытах использовано животных: 180 – морских свинок, 510 – белых мышей. Животные выводились из эксперимента в соответствии с требованиями Директивы 2010/63/EU Европейского парламента и Совета Европейского Союза от 22 сентября 2010 года по охране животных, используемых в научных целях и «Правил надлежащей лабораторной практики», утвержденных приказом Министерства здравоохранения № 199н от 01.04.2016 года [108].

Количество животных для опыта подбирали с учетом получения статистически достоверных результатов. Для каждого срока наблюдения во всех сериях эксперимента материал забирали от 5 – 12 морских свинок или белых мышей.

Изучение адгезивных свойств штаммов чумного микроба с разным плазмидным составом и их влияние на поглотительную способность фагоцитов в условиях *in vitro* осуществлялись на 60 морских свинок и 10 беспородных белых мышках обоих полов.

Оценка влияния чумного микроба с разным плазмидным составом на фагоцитарную активность перитонеальных макрофагов и полиморфноядерных лейкоцитов морской свинки в условиях *in vitro* проводилась с использованием 120 морских свинок весом 200–250 г.

Изучение популяционного состава моноклеарных клеток перитонеальной жидкости белых мышей при экспериментальной чумной инфекции проводилось на 175 беспородных, по стандартным условиям содержания и весу (18-20 г) белых мышах обоих полов.

Оценка субпопуляционного состава клеток крови в динамике инфекционного процесса, вызванного *Y. pestis* с разным плазмидным профилем проводилась на 125 сертифицированных беспородных белых мышах обоих полов весом 18-20 г.

Исследование особенностей патоморфологических и морфофункциональных изменений в иммунокомпетентных органах экспериментальных животных, инфицированных *Y. pestis* с разным плазмидным составом проведено на 200 белых мышах.

## 2.2 Штаммы чумного микроба

В работе использованы штаммы *Y. pestis* subs. *pestis* и *Y. pestis* subsp. *altaica* из коллекции музея ФКУЗ Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора (Таблица 1).

Таблица 1 – Характеристика штаммов чумного микроба

Штамм	Место выделения	Плазмидный состав	Вирулентность для белых мышей (LD <sub>50</sub> ), м.к.
<i>Y. pestis</i> subsp. <i>pestis</i> И-2638	Тувинский природный очаг чумы	pYP <sup>+</sup> pYV <sup>+</sup> pTP33 <sup>+</sup> pYT <sup>+</sup>	10 высоковирулентный
<i>Y. pestis</i> subsp. <i>pestis</i> И-3479	Получен в Иркутском противочумном институте	pYP <sup>+</sup> pYV <sup>-</sup> pTP33 <sup>+</sup> pYT <sup>+</sup>	авирулентен
<i>Y. pestis</i> subsp. <i>pestis</i> И-3480	Получен в Иркутском противочумном институте	pYP <sup>-</sup> pYV <sup>-</sup> pTP33 <sup>+</sup> pYT <sup>+</sup>	авирулентен
<i>Y. pestis</i> subsp. <i>altaica</i> И-2359	Горно-Алтайский природный очаг чумы	pYP <sup>+</sup> pYV <sup>+</sup> pYT <sup>+</sup>	4 · 10 <sup>4</sup> слабовирулентный
<i>Y. pestis</i> subsp. <i>altaica</i> И-2948	Горно-Алтайский природный очаг чумы	pYP <sup>-</sup> pYV <sup>+</sup> pYT <sup>+</sup>	3 · 10 <sup>8</sup> остаточная вирулентность
<i>Y. pestis</i> subsp. <i>altaica</i> И-2948/3	Получен в Иркутском противочумном институте	pYP <sup>-</sup> pYV <sup>-</sup> pYT <sup>+</sup>	авирулентен
<i>Y. pestis</i> subsp. <i>pestis</i> И-3560	Горно-Алтайский природный очаг чумы	pYP <sup>+</sup> pYV <sup>+</sup> pTP33 <sup>+</sup> pYT <sup>+</sup>	10 высоковирулентный
<i>Y. pestis</i> subsp. <i>altaica</i> И-2696	Горно-Алтайский природный очаг чумы	pYP <sup>-</sup> pYV <sup>+</sup> pYT <sup>+</sup>	4 · 10 <sup>4</sup> слабовирулентный

### 2.3 Питательные среды

Штаммы чумного микроба культивировали на агаре Хоттингера рН 7,2 при  $28 \pm 1$  °С 48 часов, в отдельных случаях на казеиново-дрожжевом агаре (КД), смывали 0,9 % ЗФР. Бактериальную взвесь ( $1 \cdot 10^9$  КОЕ/мл по ОСО 10 ед.) раститровывали до концентрации  $1 \cdot 10^7$  КОЕ/мл. Работа с материалом, зараженным ПБА I-II группы патогенности, проводилась в соответствии с Санитарными правилами «Безопасность работы с микроорганизмами I-II групп патогенности (опасности)» СП 1.3.3118–13 [117].

### 2.4 Молекулярно-биологический метод определения плазмидного состава

Скрининг плазмид проводили щелочным методом Т. Kieser [179] в модификации С. В. Балахонова [12, 13]. Опыт начинали с приготовления лизоцимной смеси, которая включала: 2 мг/мл лизоцима, 0,02 % бромкрезолового зеленого, 0,63 М сахарозу, 25 мМ EDTA Na<sub>2</sub> и 25 мМ трис-HCl рН 8,0, в 0,5 мл которой суспензировали одну полную петлю 24-48-часовой культуры исследуемого штамма чумного микроба. К охлажденной до  $0 \pm 1$  °С смеси через 30 минут добавляли 0,5 объема 2 % раствора додецилсульфата натрия в 0,3 М NaOH и пробы инкубировали при  $55 \pm 1$  °С в течение 30 минут. Затем лизированные клетки депротеинизировали в 1/10 объема смеси фенол/хлороформ (1:1) с 0,001 % 8-оксихинолина, интенсивно перемешивали и центрифугировали 3-5 минут при 12000 об/мин.

В качестве источника маркерных плазмид использовали штамм *Y. pestis* EV НИИЭГ (pYP 6 мДа, pYV 45 мДа, pYT 65 мДа).

Результаты плазмидного скрининга учитывали с помощью гель-электрофореза. По завершении скрининга супернатант в объеме 20 мкл вносили в лунки 0,7 % агарозного геля, помещенного в аппарат горизонтального гель-электрофореза. Электрофорез проводили в 1-кратном TBE-буфере (0,089 М трис-ОН; 0,089 М H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>; 0,002 М EDTA) при напряжении 140 В и силе тока 67 мА в течение 4 часов. Для визуализации плазмидной ДНК по завершении электрофоре-

за гель окрашивали бромидом этидиума в конечной концентрации 0,5 мкг/мл, просматривали в проходящем УФ-свете и видеорегистрировали.

## 2.5 Определение активности ферментов патогенности чумного микроба

### 2.5.1 Глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа

Активность Г6ФДГ определяли в перитонеальных макрофагах ( $2 \cdot 10^7$  клеток/мл) экспериментальных животных (контроль), в клетках чумного микроба ( $5 \cdot 10^9$ /мл), а также при взаимодействии *Y. pestis* с макрофагами (50 : 1) в условиях *in vitro* [33]. Для получения фагоцитарно-микробной взвеси к 20 млн. фагоцитов (в 1 мл среды 199) добавляли 0,2 мл  $5 \cdot 10^9$  взвеси бактерий. Фагоциты инкубировали с чумным микробом в течение 60 мин при  $37 \pm 1$  °С. Активность Г6ФДГ в фагоцитирующих перитонеальных макрофагах оценивали по формуле:  $\Delta\text{ЕОП} = \text{ЕОП}_{(\text{мФ} + \text{Y.p.})} - \text{ЕОП}_{(\text{Y.p.})}$ , где ЕОП – условные единицы оптической плотности; мФ + Y.p. – макрофагально-микробная взвесь; Y.p. – *Y. pestis*. Учет результатов осуществляли на фотометрическом анализаторе ELx808U, США. Эксперименты повторяли 3 раза. Анализ полученных результатов осуществляли стандартными статистическими методами и выражали в виде условных единиц оптической плотности как среднее (X) и стандартное отклонение (s).

### 2.5.2 Супероксиддисмутаза

Культуры выращивали на агаре Хоттингера с рН 7,2 при  $28 \pm 1$  °С в течение 48 часов. Из полученных агаровых культур по стандартному образцу мутности ГИСК им. Тарасевича ОСО 42-28-85 10 единиц готовили взвесь  $10^9$  м. к. в стандартных пробирках, содержащих 3 мл фосфатного буфера с рН 8,0 (для определения протеолитической активности), рН 7,8 (для определения супероксиддисмутазной активности) и рН 7,0 (для определения общей перекись разрушающей активности). В лунки планшета вносили по 0,15 мл (150 мкл) микробной взвеси, закрывали планшет пленкой и измеряли оптическую плотность на фотометрическом анализаторе ELx808U, США при длине волны 540 нм.

В микробную взвесь, приготовленную в фосфатном буфере с рН 7,8, добавляли лизоцим до концентрации 2 мг/мл. Далее на фотометрическом анализаторе при длине волны 540 нм измеряли оптическую плотность полученного лизата, по которой определяли степень лизиса микробных клеток в сравнении с оптической плотностью исходной микробной взвеси. Затем полученную суспензию инкубировали при  $37 \pm 1$  °С в течение 60 мин с периодическим встряхиванием, центрифугировали в течение 10 минут при 4000 об/мин. В лунки плоскодонного полистиролового планшета вносили по 0,05 мл (50 мкл) надосадочную жидкость, а в бланкирующую и контрольные лунки вместо супернатанта вносили 0,05 мл (50 мкл) буфера с рН 7,8. Непосредственно перед реакцией смешивали 1,5 мл 0,16 М раствора ФМС и 5 мл 0,61 М раствора НСТ. Затем во все лунки планшета, включая бланкирующую, добавляли по 0,065 мл (65 мкл) этой смеси. Реакцию начинали с внесения во все лунки по 0,035 мл (35 мкл) 1 мМ раствора НАД·Н. Планшет закрывали защитной пленкой. Результаты регистрировали на фотометрическом анализаторе ELx808U, США при длине волны 540 нм.

За единицу активности фермента принимают такую его концентрацию, которая ингибирует скорость реакции на 50 %, по сравнению с контролем. Контрольные показания (значение оптической плотности неингибированной реакции) принимали за 100 %. Результаты можно рассчитать по формуле:

$$E = \frac{2 \times \text{значение оптической плотности в опыте}}{\text{значение оптической плотности в контроле}},$$

где E – активность супероксиддисмутазы

Супероксиддисмутазная активность микроорганизмов выражается в единицах активности на единицу ранее измеренной оптической плотности лизата.

### ***2.5.3 Общая перекись разрушающая активность***

Микробную взвесь ( $10^9$  м. к.), приготовленную в фосфатном буфере с рН 7,0, далее инкубировали с лизоцимом в концентрации 2 мг/мл 90 мин при 37 °С. Далее на фотометрическом анализаторе при длине волны 540 нм измеряли оптическую плотность полученного лизата, по которой определяли степень лизиса



микробных клеток в сравнении с оптической плотностью исходной микробной взвеси. Затем взвесь центрифугировали в течение 10 мин при 4000 об/мин.

Непосредственно перед экспериментом готовили 0,1 % раствор  $\text{H}_2\text{O}_2$  и раствор каталазы 1 мг/мл, из которого делали серийное разведение в 8 пробирках. В пробирки, в которых планировали ставить реакции с серийными разведениями каталазы, вносили по 0,9 мл (900 мкл) фосфатного буфера с рН 7,0.

В контрольную пробу вносили 1 мл (1000 мкл), а в холостую – 2 мл (2000 мкл) буфера, содержащего лизоцим в концентрации 2 мг/мл. В пробирку для опытного образца буфер не вносили. Затем во все кроме холостой пробы добавляли по 1 мл (1000 мкл) 0,1 % раствора  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

В пробы для реакции с ферментом вносили по 0,1 мл (100 мкл) растворов каталазы, приготовленных с помощью метода серийного разведения. В опытную пробу добавляли 1 мл (1000 мкл) ферментного препарата *Y. pestis*, полученного при помощи лизоцима. Реакционные смеси инкубировали в течение 10 мин при комнатной температуре. После чего во все пробы вносили по 1 мл (1000 мкл) 4 % раствора молибдата аммония в 10 % растворе  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . При этом молибдат аммония образовывал с «неразрушенной»  $\text{H}_2\text{O}_2$  стойкий окрашенный комплекс. Далее образцы инкубировали примерно 10 мин до полного выпадения осадка в опытных образцах, затем центрифугировали в течение 5 мин при 6000 об/мин, после чего отбирали супернатант и вносили в лунки плоскодонного полистиролового планшета по 0,15 мл (150 мкл). В бланкирующую лунку вносили 0,15 мл (150 мкл) из холостой пробы. Далее планшет закрывали пленкой и измеряли оптическую плотность экспериментальных образцов на фотометрическом анализаторе при длине волны 410 нм.

Значения оптической плотности образцов каталазы с известной концентрацией, полученных с помощью метода серийного разведения, использовали для построения калибровочной кривой<sup>1</sup>. Общая перекись разрушающая активность

---

<sup>1</sup> Для каждой отдельной партии (упаковки) каталазы следует подбирать концентрацию индивидуально, поскольку их активность может существенно различаться.

микроорганизмов выражали в эквивалентных каталазе единицах активности на единицу ранее измеренной оптической плотности лизата.

#### **2.5.4 Протеолитическая активность**

В пробирку с микробной взвесью, приготовленную в фосфатном буфере с рН 8,0, добавляли лизоцим в концентрации 2 мг/мл. Далее на фотометрическом анализаторе при длине волны 540 нм измеряли оптическую плотность полученной суспензии, так называемого *лизата*, по которой определяли степень лизиса микробных клеток в сравнении с оптической плотностью исходной микробной взвеси. Затем полученную суспензию инкубировали при 37 °С в течение 60 мин, затем центрифугировали в течение 10 мин при 4000 об/мин. 0,2 мл (200 мкл) полученной надосадочной жидкости (супернатант) добавляли 0,5 мл (500 мкл) 0,2 % раствора азоказеина. В качестве положительного контроля готовили серийные разведения трипсина (к примеру, 1 : 1, 1 : 2, 1 : 4 и т.д.), при этом исходная концентрация данного препарата должна составлять примерно 1 мг/мл. В качестве отрицательного контроля использовали смесь 0,2 мл (200 мкл) фосфатного буфера с рН 8,0 с 0,5 мл (500 мкл) 0,2 % раствора азоказеина. Реакционные смеси, включая отрицательный и положительный контроли, инкубировали при  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  в течение 30 мин. Реакцию останавливали добавлением 0,2 мл (200 мкл) 10 % раствора трихлоруксусной кислоты. Затем смеси центрифугировали в течение 10 мин при 4000-6000 об/мин. Надосадочную жидкость вносили в лунки планшета по 0,15 мл (150 мкл), закрывали планшет пленкой и измеряли оптическую плотность полученных экспериментальных образцов на фотометрическом анализаторе при длине волны 340 нм.

Значения оптической плотности трипсина с известной концентрацией, полученные с помощью метода серийных разведений, использовали для построения калибровочной кривой. За единицу протеолитической активности ферментного экстракта, полученного из культуры микроорганизмов, принимали единицу ак-

тивности трипсина.<sup>2</sup> Протеолитическая активность микроорганизмов выражали в эквивалентных трипсину единицах на единицу ранее измеренной оптической плотности лизата.

## 2.6 Определение адгезивной активности чумного микроба

Кровь морских свинок, беспородных белых мышей забирали асептически в пробирку с гепарином, трехкратно отмывали ЗФР (1:1), центрифугировали при 1000 об/мин в течение 10 минут. Надосадочную жидкость удаляли, готовили 5 % взвесь эритроцитов на ЗФР.

Культуру чумного микроба выращивали на казеиново-дрожжевом агаре (КД) или Хоттингера при температуре  $28 \pm 1$  °С в течение 48 часов, смывали 0,9 % ЗФР рН 7,2, доводили до концентрации  $10^9$  м.к./мл по ОСО 10 ед. Полученную бактериальную взвесь титровали до концентрации  $10^7$  м. к./мл.

Обезжиренное тонкое промаркированное предметное стекло делили на два участка размером 1,5 x 1,5 см и наносили на первый по 5 мкл эритроцитарной ( $2 \cdot 10^5$  кл./мл) и бактериальной ( $10^7$  м.к./мл) взвесей (соотношение эритроцитов и микробов – 1 : 50). Контролем служил второй участок, на который наносили взвесь эритроцитов в той же концентрации и объеме 5 мкл с ЗФР рН 7,2 (по 5 мкл соответственно). Содержимое перемешивали пипетированием. Стекло помещали во влажную камеру (чашка Петри с диском фильтровальной бумаги, увлажненным дистиллированной водой) в термостат на 30 минут при температуре  $37 \pm 1$  °С, через каждые 5 минут осторожно покачивали.

После инкубации препарат высушивали на воздухе и фиксировали в течение 20 минут в смеси Никифорова. В качестве красителя использовали рабочий раствор отфильтрованной краски Романовского-Гимза. Окрашенные в течение 10 минут препараты промывали в проточной воде.

Для количественной оценки адгезивной активности использовали световой микроскоп «Zeiss» (Германия) с видеокамерой «Moticam 2000», объектив x 90, окуляр x 10 и счетчик для подсчета эритроцитов.

---

<sup>2</sup> Препараты трипсина, используемые в качестве стандартов, могут содержать разное количество единиц активности на 1 мг массы. Эти значения обычно указаны на упаковке и должны быть использованы при расчетах

Эритроциты подсчитывали в 10 полях зрения (не менее 100 клеток). Адгезивные свойства оценивали по 3 показателям: среднему показателю адгезии (СПА), коэффициенту адгезии (КА), индексу адгезивности микроорганизма (ИАМ). СПА – среднее количество микробов, прикрепившихся к одному эритроциту, КА – процент эритроцитов, имеющих на своей поверхности фиксированные микробы от общего числа учтенных клеток, ИАМ – среднее число микробных клеток на одном участвующем в адгезивном процессе эритроците, которое определяется по формуле:

$$\text{ИАМ} = (\text{СПА} \times 100) / \text{КА}$$

Показатель ИАМ, не превышающий 2,00, указывает на низкую адгезивную активность чумного микроба, что свидетельствует об авирулентности штамма для белых мышей. ИАМ в пределах от 2,01 до 4,00 соответствует слабовирулентным штаммам, а при индексе более 4,00 – вирулентным штаммам.

## **2.7 Получение макрофагов, полиморфноядерных лейкоцитов и лимфоцитов**

В ходе предварительных исследований нами отработаны и в ряде случаев оптимизированы методы получения перитонеальных макрофагов (ПМ) и полиморфноядерных лейкоцитов (ПЯЛ), которые в конечном итоге сводятся к следующему.

### ***2.7.1 Получение резидентных перитонеальных макрофагов***

Резидентные ПМ получали в соответствии с двумя методическими приемами.

В первом случае для выделения макрофагов объектом служили интактные морские свинки. Перитонеальный экссудат вместе с клетками, в норме заселяющими брюшную полость, вымывали средой 199, разведенной 1 : 10 ЗФР рН 7,2 [18].

Во втором случае морским свинкам за 8–9 сут до отбора материала внутрибрюшинно вводили по 10 мл стерильного вазелинового масла (ГОСТ 3164-78) или 5 % раствора пептона [130]. Клетки вымывали цитратно-солевым раствором (26

мл насыщенного раствора хлористого натрия (ГОСТ 4233-77, ч.д.а.) и 4 г лимоннокислого натрия (ТУ 6-09-2248-77, х.ч.) на 1 л H<sub>2</sub>O), стерилизованным при 120 ± 1°C в течение 30 мин. Отобранный в охлажденные стерильные пробирки перитонеальный экссудат центрифугировали при 250 g в течение 5 мин и осадок макрофагов отмывали двукратно средой 199, разведенной 1 : 10 ЗФР, путем центрифугирования при 250 g в течение 5 мин. Отмытые клетки ресуспендировали в среде 199. Количество макрофагов подсчитывали в камере Горяева.

От одной морской свинки без предварительной стимуляции получали до 20–30 · 10<sup>6</sup> кл/мл, после стимуляции вазелиновым маслом или 5 % раствором пептона – до 100–120 · 10<sup>6</sup> кл/мл (и более) макрофагов.

### ***2.7.2 Получение полиморфноядерных лейкоцитов***

Источником ПЯЛ служил перитонеальный экссудат морских свинок, который получали по общепринятой методике [134]. Для стимуляции процесса накопления и вымывания ПЯЛ животным внутрибрюшинно вводили 50 мл солевого раствора (26 мл насыщенного раствора хлористого натрия на 1 л H<sub>2</sub>O), через 4 ч таким же образом – 40 мл цитратно-солевого раствора. Для получения ПЯЛ в больших количествах животных предварительно стимулировали путем внутрибрюшинной инъекции 20 мл 5 % раствора пептона. Через 18 ч экссудат вымывали из брюшной полости стерильным цитратно-солевым раствором. От одной морской свинки таким способом можно получить до 1·10<sup>9</sup> кл/мл. Состав экссудата представлен: 84,0 ± 3,0 % ПЯЛ, 11,0 ± 1,0 % макрофагов, встречаются лимфоциты и эозинофилы. Число фагоцитов подсчитывали в камере Горяева. Жизнеспособность клеток оценивали по методу, основанному на окрашивании погибших клеток метиловым синим [130].

Полученные взвеси клеток хранили в пробирках на льду.

### ***2.7.3 Получение лимфоцитов***

К 5,0 мл гепаринизированной крови животных (10 ед/мл) добавляли 0,5 мл 1 % раствора желатина, приготовленного на среде 199, инкубировали при 37 °С в течение 30 мин. Суспензию центрифугировали при 350 g в течение 12 мин, затем

осадок клеток дважды (в течение 7 мин при 350 g) отмывали от желатина охлажденной средой 199 и ресуспендировали в 1 мл среды 199.

Число полученных клеток подсчитывали в камере Горяева. Жизнеспособность фагоцитов оценивали в тесте с трипановым синим или на проточном цитофлуориметре. Для этого к 50 мкл суспензии клеток добавляли 5 мкл 7-аминоактиномизина (7-AAD), инкубировали на льду в течение 5–15 мин, доводили полученную суспензию раствором фосфатно-солевого буфера до 0,4 мл и проводили подсчет живых клеток на цитометре. Содержание мертвых клеток не должно превышать 10 %.

## 2.8 Определение фагоцитарной активности макрофагов

В опытах использовали переживающую однослойную культуру ПМ морской свинки, приготовленную с соблюдением правил и условий получения первичных тканевых культур (включающих обработку лабораторной посуды, работу в условиях строгой асептики и применение стандартных питательных сред) [130, 134].

В реакции фагоцитоза соотношение макрофагов (как интактных – контроль, так и примированных чумным микробом – опытная проба) и микробов составляло 1 : 50. На обезжиренные предметные стекла наносили макрофагально-микробную взвесь, помещали во влажную камеру при повышенном до 5 % содержании CO<sub>2</sub> и инкубировали 30–180 мин при температуре  $37 \pm 1$  °С. Макрофаги, обладающие высокой способностью к адгезии, прочно прикреплялись к стеклу, а сопутствующие им гранулоциты, лимфоциты и тучные клетки удалялись при дальнейшем многократном промывании монослоя. По завершению опыта препараты, содержащие монослой макрофагов, фиксировали в смеси Никифорова в течение 20 мин и окрашивали по Романовскому-Гимза. Препараты просматривали в световом микроскопе при иммерсионном объективе.

Для оценки интенсивности фагоцитоза определяли следующие показатели:

- фагоцитарное число (ФЧ) – среднее количество микробов, поглощенных одним фагоцитом;

- процент активных фагоцитов (ПАФ) – число фагоцитарноактивных макрофагов на 100 сосчитанных;
- цитопатическое действие бактерий – количество разрушенных и поврежденных макрофагов на 100 изученных;
- процент завершенности фагоцитоза, который рассчитывали по формуле (ИЗФ):

$$\frac{\Phi_{30\text{мин}} - \Phi_{180\text{мин}}}{\Phi_{30\text{мин}}} \cdot 100 \%,$$

где:  $\Phi_{30\text{ мин}}$  и  $\Phi_{180\text{ мин}}$  – фагоцитарное число через 30 (захват микроба фагоцитом) и 180 мин контакта макрофагов с микробами.

При завершенном фагоцитозе значения будут положительными, при незавершенном (размножение микробов в макрофагах) – отрицательными.

## **2.9 Определение бактерицидной активности фагоцитов**

### **2.9.1 НСТ-тест**

Для оценки интенсивности образования в фагоцитирующих клетках метаболитов кислорода использовали НСТ-тест.

Спектрофотометрический метод постановки реакции НСТ-теста по методу Л. М. Сомовой [87] в нашей модификации [88] проводили в полистироловых 96-луночных планшетах.

В лунки к адгезированным на пластик и отмытым раствором Хенкса клеткам добавляли по 100 мкл раствора НСТ (раствор НСТ из расчета 0,5 мг/мл: сначала краситель растворяли в двух каплях 70 ° спирта, затем добавляли среду 199). В опытные лунки вносили по 20 мкл микробной взвеси, в контрольные – по 20 мкл среды 199. После инкубации в течение 120 мин при  $37 \pm 1^\circ\text{C}$  клеточный монослой с образовавшимися зернами диформаза осторожно, но тщательно дважды отмывали от раствора НСТ и непоглощенных бактерий, высушивали, клетки разрушали путем добавления в лунки по 50 мкл предварительно разогретого до  $80^\circ\text{C}$  диметилсульфоксида (ДМСО). Оптическую плотность измеряли на фотометрическом анализаторе ELx808U, США при длине волны ( $\lambda$ ) 540 нм, blankируя по

ДМСО. Средние показатели как индуцированного (опыт), так и спонтанного (контроль) НСТ-теста рассчитывали после трехкратного определения.

Поглотительную активность фагоцитирующих клеток рассчитывали по формуле:

$$\text{ФИП} = (\text{ЕОП}_o - \text{ЕОП}_{к1}) + (\text{ЕОП}_o - \text{ЕОП}_{к2}) / (\text{ЕОП}_{к1} + \text{ЕОП}_{к2}) \cdot 100 \%, \text{ где:}$$

ФИП – индекс поглощения;

ЕОП<sub>o</sub> – единицы оптической плотности в опытной пробе;

ЕОП<sub>к1</sub> – единицы оптической плотности в контрольной пробе № 1;

ЕОП<sub>к2</sub> – единицы оптической плотности в контрольной пробе № 2.

Индекс стимуляции КЗМ фагоцитов (НСТ-тест) рассчитывали по формуле:

$$\text{ИС}_{\text{нст}} = \text{ЕОП}_{(o)} - \text{ЕОП}_{(к)} / \text{ЕОП}_{(к)} \times 100 \%$$

ЕОП<sub>o</sub> – единицы оптической плотности в опытной пробе;

ЕОП<sub>к</sub> – единицы оптической плотности в контрольной пробе.

### **2.9.2 Активность глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы**

Активность глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (Г6ФДГ, КФ 1.1.1.49) определяли спектрофотометрическим методом М. И. Прохоровой [110] в модификации Е. П. Голубинского с соавт. [33].

В лунки планшета вносили по 50 мкл лейкоцитарной взвеси (фагоциты, примированные чумным микробом – опыт; фагоциты интактные – контроль), инкубировали при 37 °С 180 мин, добавляли в каждую лунку по 100 мкл 0,05 М раствора Г6Ф (натриевая соль) и 0,25 М раствора НАДФ в 0,01 М трис-НСl буфере рН 7,6, приготовленные *ex tempore*. Через 5 мин результаты регистрировали на фотометрическом анализаторе ELx808U (США) при  $\lambda = 340$  нм. В контрольных пробах растворы Г6Ф и НАДФ замещали трис-НСl буфером рН 7,6.

Активность Г6ФДГ выражали в условных единицах:  $E_{340}/5$  мин/мг белка, где  $E_{340}$  – оптическая плотность. Индекс стимуляции активности Г6ФДГ вычисляли как соотношение величин оптической плотности в опытной и контрольной пробах.



### **2.9.3 Активность миелопероксидазы**

Активность миелопероксидазы (МПО, КФ 1.11.1.7) определяли спектрофотометрическим методом. В соответствии с процедурой Т. Л. Бурой с соавт. [46], по 100 мкл лейкоцитарной взвеси (фагоциты, примированные чумным микробом – опыт; фагоциты интактные – контроль) вносили в лунки планшета, инкубировали при  $37 \pm 1$  °С в течение 180 мин, в каждую лунку добавляли по 100 мкл  $4 \cdot 10^{-4}$  % раствора о-фенилендиамина в фосфатно-цитратном буфере рН 5,5, приготовленного *ex tempore*, и раствор перекиси водорода до конечной концентрации 0,015 %. Реакцию останавливали добавлением во все лунки по 100 мкл 10 %  $H_2SO_4$ . Результаты регистрировали на фотометрическом анализаторе ELx808U (США) при  $\lambda = 492$  нм. Активность фермента выражали в условных единицах оптической плотности.

### **2.9.4 Содержание неферментных катионных белков**

Содержание неферментных катионных белков (НКБ) определяли по методу Л. М. Сомовой с соавт. [87] в модификации [88]. В лунки с фиксированными на пластике фагоцитами (фагоциты, примированные чумным микробом – опыт; фагоциты интактные – контроль) вносили по 50 мкл раствора прочного зеленого, растворенного в метаноловом трис-буфере в соотношении 1 : 1, монослой клеток инкубировали в течение 30 мин при  $37 \pm 1$  °С. Невключившийся в реакцию краситель дважды отмывали раствором Хенкса. Краситель, связанный с катионными белками фагоцитов, растворяли добавлением ДМСО (50 мкл), который предварительно разогревали на водяной бане до  $80 \pm 1$  °С. Оптическую плотность раствора измеряли на фотометрическом анализаторе ELx808U (США) при  $\lambda = 620$  нм, бланкировали по ДМСО.

### **2.9.5 Активность супероксиддисмутазы**

Активность супероксиддисмутазы (СОД, КФ 1.15.1.1) в фагоцитах оценивали по ингибированию скорости восстановления нитросинего тетразолия в системе феназинметосульфата и НАД·Н. Лейкоцитарную взвесь (фагоциты, примирован-

ные антигеном – опыт; фагоциты интактные – контроль) разливали по 50 мкл в лунки планшета, инкубировали при  $37 \pm 1$  °С в течение 30 мин или 180 мин и добавляли в каждую лунку по 65 мкл приготовленного *ex tempore* раствора (0,16 мМ феназинметосульфат и 0,61 мМ НСТ в 0,15 М фосфатном буфере рН 7,4). Контролем служили интактные макрофаги или ПЯЛ в том же соотношении, что и опытных пробах, а вместо лейкоцитарной взвеси добавляли фосфатный буфер. Реакцию начинали внесением в пробу 35 мкл 1 мМ НАД·Н в фосфатном буфере. Реакцию останавливали ледяной уксусной кислотой (50 мкл в каждую лунку). Результаты регистрировали через 1 мин спектрофотометрически на фотометрическом анализаторе ELx 808 Biotex (США) при  $\lambda=540$  нм. За единицу активности СОД принимали количество фермента, необходимое для ингибирования восстановленного НСТ. Расчет вели по формуле:  $E_{540}/1$  мин/мг белка, где  $E_{540}$  – оптическая плотность, и выражали в условных единицах. В части опытов активность СОД рассчитывали по калибровочной кривой, выполненной со стандартным препаратом фермента (Serva, США), и выражали в мкг/ $10^7$  клеток за период инкубации (1 мин).

Для определения активности СОД в 300 мкл микробной взвеси, приготовленной в фосфатном буфере рН – 7,8, вносили 390 мкл смеси 0,16 М раствора феназинметосульфата (Sigma, США) и 0,61 мМ нитросинего тетразолия (Sigma, США) в соотношении 1,5/5мл. ФМС/НСТ(1,5/5мл). Реакцию начинали добавлением в реакционную смесь 210 мкл НАД·Н (Sigma, США). Через 1 мин инкубации реакцию останавливали внесением 300 мкл ледяной уксусной кислоты. Реакционную смесь центрифугировали при 6000 об./мин. Результаты регистрировали на фотометрическом анализаторе ELx 808 Biotex (США) при длине волны 540 нм. За единицу активности фермента принимали такое его количество, которое уменьшало скорость неингибированной реакции на 50 %.

### **2.9.6 Перекись разрушающая активность**

Для определения общей перекись разрушающей активности в 1 мл взвеси вносили 1 мл 0,1 %  $H_2O_2$  , инкубировали 5 мин, затем в смесь вносили 1 мл 4 %

молибдата аммония в 10 %  $H_2SO_4$ , центрифугировали 5 мин при 6000 об./мин. Результаты регистрировали на фотометрическом анализаторе ELx 808 Biotex (США) при длине волны 410 нм. Общую перекись разрушающую активность выражали в эквивалентных каталазе единицах на 1 мл взвеси.

### **2.10 Оценка активации тучных клеток**

В работе использовали методы обзорной микроскопии. Количественную оценку общего числа лейкоцитов проводили с использованием унифицированного метода подсчета клеток в камере Горяева. Процентное соотношение различных видов лейкоцитов проводили методом морфологического исследования перитонеальной жидкости в мазках. При исследовании препаратов с использованием компьютерной программы «Motic Images Plus» (версия 2) осуществляли дифференцированный подсчет тучных клеток (ТК), измеряли их диаметр и площадь. Степень активации ТК оценивали по индексу дегрануляции клеток (ИДТК) – процентное соотношение дегранулированных тучных клеток к их общему числу [26, 61]. Автоматический анализ изображения производили с помощью светового микроскопа «Zeiss» (Германия) с видеокамерой «Moticam 2000», разрешение 1392×1040 пикселей, ок. 10, об. 100.

### **2.11 Подготовка образцов клеток крови животных для исследования в условиях *in vitro* на проточном цитометре**

Все культуры *Y. pestis*, взятые для исследования, выращивали на агаре Хоттингера рН 7,2 при температуре 28 °С в течение 48 часов. Из полученных агаровых культур по стандартному образцу мутности ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России ОСО 42-28-85 (10 МЕ) в стерильной стандартной пробирке с 2-3 мл фосфатно-солевого буфера рН 7,2 готовили взвесь микроорганизмов концентрацией  $10^9$  м.к./мл.

Лейкоциты от интактных беспородных белых мышей получали из цитратной крови (100 мкл 3,8 % цитрата натрия на 1 мл крови) общепринятыми методами.

Подсчет клеток проводили в камере Горяева и доводили концентрацию клеточной суспензии до  $2 \cdot 10^7$  кл/мл с помощью центрифугирования.

К суспензии клеток добавляли микробную взвесь *Y. pestis* в концентрации, необходимой для проведения эксперимента (например: соотношение лейкоцитов к микробным клеткам 1 : 50), и инкубировали в течение 30-60 минут при комнатной температуре.

## **2.12 Подготовка образцов крови инфицированных экспериментальных животных для исследования на проточном цитометре**

Работу с инфицированными животными проводили в соответствии с СП 1.3.3118-13 «Безопасность работы с микроорганизмами I-II групп патогенности (опасности)» [117] и методическими рекомендациями [92].

Кровь получали из сердца зараженного животного, предварительно обездвиженного хлороформом, зафиксированного на доске для вскрытия, шприцом 1-2 см<sup>3</sup>, заранее обработанным 3,8 % раствором цитрата натрия, из вскрытой грудной клетки. Полученный биологический материал переносили в градуированные микропробирки.

Обеззараживание проводили в блоке для работы с инфицированными животными. В работе использовали 10 % формалин, который готовили непосредственно перед работой.

К материалу для исследования (кровь экспериментальных животных), содержащему бактерии чумного микроба, добавляли формалин до конечной концентрации – 2 % (22 мкл 10 % формалина на 100 мкл крови). Смесь перемешивали и выдерживали в течение 20 мин при комнатной температуре. Проверку специфической стерильности обеззараженной крови осуществляли в соответствии с «Инструкцией по контролю специфической стерильности экспериментальных препаратов, приготовленных из культур чумного или холерного микробов» [47].

Согласно заключению комиссии ФКУЗ Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора от 30.04.2015 г. (созданной на основании приказа № 47-ПР от 30.03.2015 г.) биологический мате-

риал (кровь), содержащий *Y. pestis*, обработанный формалином предложенным методом, специфически стерилен.

Окрашивание обеззараженной суспензии клеток проводили с использованием моноклональных антител в соответствии с инструкцией к тест-системе в помещении для иммунологических исследований. Анализ окрашенных образцов осуществляли на проточном цитофлуориметре BD FACSCanto™ II в программе BD Diva 6.0.

### 2.13 Определение фенотипа клеток крови

Материалом для исследования служили лимфоциты, выделенные из гепаринизированной крови мышей. Кровь отстаивали до четкого разделения эритроцитов и плазмы в течение 40–60 мин на льду. Отбирали плазму и верхний слой эритроцитов, центрифугировали при 250 g в течение 5 мин, осадок ресуспендировали в 5 мл лизирующего буфера (BD Biosciences, Oxford, UK), инкубировали 5 мин на льду, отмывали при 250 g в течение 2 мин и доводили до концентрации  $2 \cdot 10^7$  кл/мл фосфатно-солевым буфером. Жизнеспособность клеток в тесте с трипановым синим составляла 96–98 %.

#### 2.13.1 Титрование антител

Суспензию лимфоцитов в концентрации  $2 \cdot 10^7$  кл/мл раскапывали в полистироловые пробирки по 50 мкл ( $10^6$  клеток) и добавляли соответствующую концентрацию титруемого антитела (Таблица 2).

Таблица 2 – Схема подготовки проб для титрования антител

Реагент	№ пробирки							
	1	2	3	4	5	6	7	8
	Объем реагента, мкл							
Суспензия лимфоцитов	50	50	50	50	50	50	50	50
Антитело	0,5	0,7	1	2	4	6	8	–
Антитело изотипического контроля	0,5	0,7	1	2	4	6	8	–

Пробы инкубировали на льду в течение 20 мин при комнатной температуре в темноте. Затем в каждую пробирку добавляли по 1–2 мл контрастирующего буфера (BD Pharmingen Stain (BSA)), осторожно перемешивали и центрифугировали при 250 g в течение 5 мин при 4 °С. Супернатант удаляли, а осадок ресуспендировали в 0,5 мл контрастирующего буфера.

Проводили настройку оптимального напряжения фотоумножителей для SSC и FSC на проточном цитофлуориметре (Becton Dickinson FACS Canto II, США) и собирали 10 000 событий для каждой пробирки.

### **2.13.2 Приготовление раствора реагентов**

Общий объем раствора антител, необходимый для проведения анализа проб ( $O_p$ ), рассчитывали по формуле  $O_p = n \times 50$  мкл, где  $n$  – число проб. Общий объем рабочего разведения для каждого реагента (FITC CD3, APC-Cy7 CD8,  $O_3$ ,  $O_4, \dots O_8$ ), содержащий оптимальное количество антител, необходимое для окрашивания  $n$  образцов рассчитывали с учетом рабочего объема реагентов (таблица 3) умноженное на число  $n$ . Общий объем реагентов рассчитывали по формуле:  $O_k = O_1 + O_2 + \dots + O_8$ .

Объем контрастирующего буфера ( $O_{KB}$ ), необходимого для разведения общего объема реагентов ( $O_k$ ), рассчитывали по формуле:  $O_{KB} = O_p - O_k$  и добавляли в пробирку, содержащую  $O_k$ .

### **2.13.3 Окрашивание клеток крови**

Фенотип лимфоцитов определяли с использованием моноклональных антител (Becton Dickinson, США) в следующей панели: CD45-PE-Cy5/CD3-FITC/CD4-Alexa-700/CD8-APC-Cy7/CD25-PE-Cy7/ИЛ-1 $\alpha$ -PE/ИЛ-4-APC.

Клетки в концентрации  $2 \cdot 10^5$  инкубировали с чумным микробом в течение 3 часов. По истечении времени инкубации к клеткам добавляли 50 мкл раствора  $O_p$ , инкубировали 30 мин. Затем добавляли 0,5 мл ЗФР с 0,5 % бычьим сывороточным альбумином (BSA, Gerbu, Германия) и 0,1 %  $\text{NaN}_3$ , центрифугировали при 250 g в течение 5 мин, осадок клеток ресуспендировали в 0,5 % Permeabilizing Solution (BD Biosciences, США) и инкубировали 15 мин. После этого добавляли

0,5 мл ЗФР с БСА и  $\text{NaN}_3$ , центрифугировали при 250 g в течение 5 мин. Затем добавляли 50 мкл раствора антитела для окрашивания внутриклеточных цитокинов, состоящего из PE Hamster Anti-Mouse IL-1 $\alpha$  и APC Rat Anti-Mouse IL-4, инкубировали 30 мин, отмывали при 250 g в течение 5 мин, осадок ресуспендировали в 450 мкл 1 % параформальдегида. Анализ окрашенных образцов проводили на проточном цитофлуориметре BD FACSCanto™ II в программе BD Diva 6.0. В каждой пробе анализировалось 10 000 событий.

Популяции моноцитов и лимфоцитов идентифицировали на основе комбинации SSC и CD45 на графике DotPlot. Для изучения Т-клеточного звена определяли следующие субпопуляции: активированные Т-лимфоциты ( $\text{CD3}^+\text{CD25}^+$ ), активированные Т-хелперы ( $\text{CD3}^+\text{CD4}^+\text{CD25}^+$ ), активированные цитотоксические Т-лимфоциты ( $\text{CD3}^+\text{CD8}^+\text{CD25}^+$ ), регуляторные Т-лимфоциты ( $\text{CD3}^+\text{CD4}^+\text{CD25}^{\text{high}}$ ). Для изучения моноцитарного звена оценивали активированные моноциты ( $\text{CD25}^+$ ).

#### **2.13.4 Определение относительного и абсолютного количества клеток крови**

Субпопуляционный состав клеток крови мышей определяли методом шестипараметрического фенотипирования с использованием реагентов фирмы Becton Dickinson (США): CD45-PE-Cy5, CD3-FITC, CD4-Alexa-700, CD8-APC-Cy7, CD25-PE-Cy7, CD19-APC.

В полистироловые пробирки BD Trucount™ Tubes (BD Biosciences, Oxford, UK) раскапывали по 50 мкл гепаринизированной крови. Параллельно ставили пробирку аутофлуоресцентного контроля, содержащую 50 мкл гепаринизированной крови и 50 мкл ЗФР. Затем в каждую пробирку с опытным образцом добавляли по 50 мкл  $\text{O}_p$ , пробирки аккуратно встряхивали. Инкубировали (в темноте) в течение 30 мин при 4 °C. По истечении времени эритроциты лизировали 0,5 мл разведенного 1 : 10 FACS Lysing Solution.

Абсолютное количество клеток подсчитывали по следующей формуле:

$$\frac{K \times \text{KBeads}_{\text{уп}}}{\text{KBeads} \times V},$$

где  $K$  – количество клеток, зарегистрированных прибором;  $K\text{Beads}_{\text{уп}}$  – количество частиц в пробирке (на упаковке);  $K\text{Beads}$  – количество частиц, зарегистрированных прибором;  $V$  – объем пробы (50 мкл).

#### **2.14 Гистологические методы исследования**

Для оценки действия чумного микроба с разным плазмидным спектром исследовали иммунокомпетентные органы (регионарные лимфатические узлы, селезенка, тимус) животных через 3, 7, 9 сут после их введения. Материал фиксировали в 10 % нейтральном формалине, обезвоживали в спиртах возрастающей концентрации, заливали в парафин. Тканевые срезы толщиной 6 мкм окрашивали гематоксилин-эозином, метиловым зеленым-пиронином, по Ван-Гизону [72, 113].

В работе использовали методы обзорной микроскопии [36, 116]. Количественную оценку клеточного состава и объемных долей коркового и мозгового вещества лимфатического узла и тимуса, а также белой и красной пульпы селезенки проводили с использованием морфометрии (при увеличении окуляра – 7, объектив – 8, на площади квадрата сетки  $360\,000\ \text{мкм}^2$ , в 10 полях зрения) [80, 99, 100, 113] и компьютерной программы «Motic Images Plus» (версия 2) в следующих структурных компонентах: лимфатический узел – герминативный центр (реактивный) и корона лимфатического фолликула; тимус – корковое и мозговое вещество; селезенка – периартериальная зона, реактивный центр, мантийная и краевая зоны лимфатического фолликула (100 измерений клеточных элементов в различных участках на 5 срезах при помощи 25-узловой сетки на условной единице площади гистологического среза, равной  $2\,500\ \text{мкм}^2$ , с использованием масляной иммерсии при увеличении окуляра – 7, объектива – 90). Автоматический анализ изображения производили с помощью светового микроскопа «Zeiss» (Германия) с видеокамерой «Moticam 2000», разрешение  $1392 \times 1040$  пикселей, объектив 100. Подсчитывали число следующих видов клеток с помощью программы «Видео-Тест-Морфология», версия 4 (Санкт-Петербург): бластные формы клеток, малые лимфоциты, средние лимфоциты, плазматические клетки, макрофаги, а также



стромальные элементы. Критериями дифференцировки являлись: форма, размер и окраска клетки, ядерно-цитоплазматическое соотношение, плотность ядра.

В тимусе определяли относительное содержание венозных сосудов, а также соединительной ткани и телец Гассала, подсчитывая их количество в узловых точках стереометрической сетки на стандартной площади среза – 14400 мкм<sup>2</sup>.

### **2.15 Статистические методы**

Статистическую обработку данных проводили при помощи стандартного пакета прикладных программ Statistica, версия 6.1 (Copyright©StatSoft, Inc 19842001, ИПЧИ 31415926535897). При анализе данных определяли тип распределения с помощью тестов Колмогорова-Смирнова, Лиллиефорса и Шапиро-Уилка. Однородность дисперсий оценивали по критерию Левена. Для решения проблемы множественных сравнений статистическую обработку средних величин проводили с использованием критерия ANOVA. Для определения достоверности различий путем попарного сравнения групп использовали t-критерий Стьюдента для независимых выборок с поправкой Бонферрони и F-критерий. Данные представлены в виде среднего арифметического  $\pm$  среднее квадратичное отклонение. Различия считали достоверными при уровне значимости  $P < 0,01$ .

## ГЛАВА 3 РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

### 3.1 Антифагоцитарные свойства штаммов *Y. pestis* с разным плазмидным составом

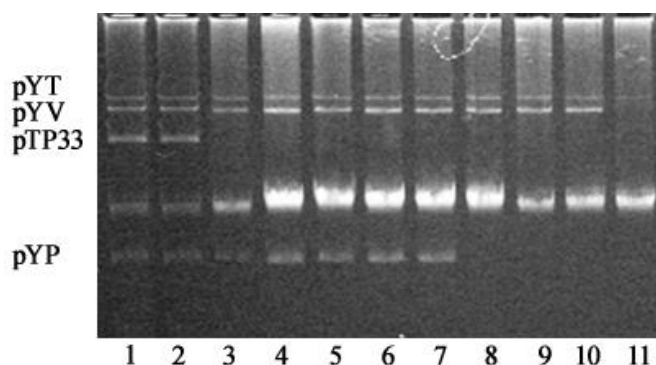
#### 3.1.1 Характеристика плазмидного состава *Y. pestis* основного и алтайского подвидов

Для комплексного сравнительного исследования механизмов реализации патогенного потенциала *Y. pestis*, обусловленного особенностями плазмидного состава возбудителя чумы, циркулирующего в Тувинском и Горно-Алтайском природных очагах чумы, провели эксперименты с использованием штаммов *Y. pestis* subsp. *pestis* И-2638 (pYP<sup>+</sup>pYV<sup>+</sup>pTP33<sup>+</sup>pYT<sup>+</sup>), его производными *Y. pestis* subsp. *pestis* И-3480 (pTP33<sup>+</sup>pYT<sup>+</sup>) и *Y. pestis* subsp. *pestis* И-3479 (pYP<sup>+</sup>pTP33<sup>+</sup>pYT<sup>+</sup>) [13], а также *Y. pestis* subsp. *altaica* И-2359 (pYV<sup>+</sup>pYT<sup>+</sup>) *Y. pestis* subsp. *altaica* И-2948 (pYV<sup>+</sup>pYT<sup>+</sup>) и селекционированным от него *Y. pestis* subsp. *altaica* И-2948/3 (pYT<sup>+</sup>).

Согласно литературным данным, подавляющее большинство факторов вирулентности *Y. pestis* связаны с плазмидным составом [7, 12]. Геном возбудителя чумы основного подвида – *Y. pestis* subspecies *pestis* имеет три плазмиды – pYV (45мДа), pYP (6мДа) и pYT (61мДа), их роль в реализации патогенных свойств иерсиний достаточно хорошо изучена. С наличием плазмиды pYV штаммы иерсиний проявляют многие фенотипические признаки: клеточную адгезию, аутоагглютинацию, поверхностную агглютинацию, а также синтез белков наружной мембраны, в том числе V- и W-антигенов и других белков, действие которых направлено на подавление фагоцитарной активности клеток иммунной системы. Плазмиды pYP и pYT видоспецифичны. Плазмида pYP детерминирует синтез бактериоцина пестицина 1 и активатора плазминогена, а плазмида pYT кодирует два наиболее хорошо изученных фактора вирулентности – мышинный токсин и F1

капсулы [189, 212]. Отличительным признаком возбудителя, циркулирующего в Тувинском очаге, является наличие в его геноме дополнительной четвертой плазмиды рТР33 с пока невыясненными функциями. Предполагают, что данная плазида представляет собой генетически модифицированный вариант резидентной плазмиды 9,5 kD, несущей гены *pla* (активатор плазминогена) и *pst 1* (пестицин 1) [212]. Утрата плазмид приводит к изменению биохимических, культуральных свойств, а также к снижению или полной утрате вирулентности возбудителя [4, 123, 144, 192].

Плазмидный состав взятых в исследование штаммов возбудителя чумы, циркулирующего в Тувинском и Горно-Алтайском природных очагах, подтвержден методом электрофоретического анализа и ПЦР сотрудниками лаборатории чумы ФКУЗ Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора (Рисунок 1).



1 – *Y. pestis* subsp. *pestis* И-2638; 2 – *Y. pestis* subsp. *pestis* И-3560; 3 – *Y. pestis* subsp. *altaica* И-2996; 4 – *Y. pestis* subsp. *altaica* И-2359; 5 – *Y. pestis* subsp. *altaica* И-2359/1; 6 – *Y. pestis* subsp. *altaica* И-2359/2; 7 – *Y. pestis* subsp. *altaica* И-2359/3; 8 – *Y. pestis* subsp. *altaica* И-2948; 9 – *Y. pestis* subsp. *altaica* И-2948/1; 10 – *Y. pestis* subsp. *altaica* И-2948/2; 11 – *Y. pestis* subsp. *altaica* И-2948/3

Рисунок 1 – Плазмидный спектр штаммов *Y. pestis*

Как известно, при инфекционном процессе, вызванном *Y. pestis*, происходит нарушение окислительного фосфорилирования и транспорта электронов в ферментной цепи за счет торможения энзиматической активности дегидрогеназ. Активность ферментов гликолиза (гексокиназы, фосфогексоизомеразы, альдолазы, глицеральдегид-3-фосфат-дегидрогеназы) у чумного микроба значительно выше

активности глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (Г6ФДГ), 6-фосфоглюконат-дегидрогеназы и транскетолазы. Из перечисленных энзимов апотомического пути наиболее низкой активностью обладает Г6ФДГ. Антимикробный потенциал фагоцитирующих клеток, способный определять развитие типовых патологических процессов, является физиологической основой клеточной защиты макроорганизма от возбудителя чумы. В настоящее время фагоцитарная система макроорганизма рассматривается как важнейший эффектор структурного гомеостаза, направленный на уничтожение микробов [48, 136, 137, 138, 147].

В связи с этим, проведение экспериментальных исследований по установлению патогенных действий возбудителя на макроорганизм является актуальной проблемой патологической физиологии, поскольку большая часть патогенного потенциала чумного микроба, циркулирующего в природных очагах, для людей остается неизвестной.

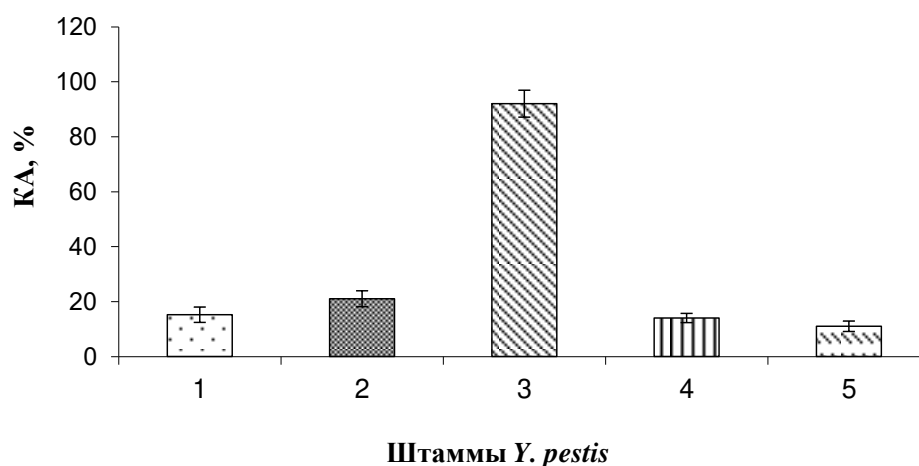
### **3.1.2 Адгезивные и поглотительные свойства *Y. pestis* с разным плазмидным составом**

Оценку адгезивных свойств штаммов чумного микроба с разным плазмидным составом и их влияние на поглотительную способность фагоцитов проводили в условиях *in vitro*. Материалом для получения эритроцитов служила венозная кровь клинически здоровых лабораторных животных. Адгезивную активность выявляли по методу В. И. Брилис с соавт. [74] в собственной модификации по коэффициенту адгезии (КА). Фагоцитарную активность перитонеальных макрофагов (ПМ) определяли по поглотительной способности фагоцитов (фагоцитарный индекс поглощения, ФИП, %), примированных чумным микробом с разным плазмидным составом в течение 30 минут при 37 °С. Контролем служили интактные фагоциты.

Показано, что чумной микроб, независимо от его фенотипических свойств, проявляет высокую способность реагировать с эритроцитами белых мышей.

Показатели адгезивной способности чумного микроба в отношении эритроцитов белых мышей в условиях *in vitro* представлены на рисунке 2.

Максимальные значения коэффициента адгезии зарегистрированы для штамма *Y. pestis* subsp. *pestis* И-2638. У штамма *Y. pestis* subsp. *altaica* И-2359, а также у *Y. pestis* subsp. *pestis* И-3479, и *Y. pestis* subsp. *pestis* И-3480 показатели адгезивной способности в отношении эритроцитов белых мышей были ниже по сравнению с *Y. pestis* И-2638 (в 4,3; 6,6 и 8,4 раза, соответственно).



1 – *Y. pestis* subsp. *altaica* И-2948/3; 2 – *Y. pestis* subsp. *altaica* И-2359;  
3 – *Y. pestis* subsp. *pestis* И-2638; 4 – *Y. pestis* subsp. *pestis* И-3479; 5 –  
*Y. pestis* subsp. *pestis* И-3480

Рисунок 2 – Адгезивная способность чумного микроба в отношении эритроцитов белых мышей в условиях *in vitro* (KA, %)

Установлена высокая поглотительная способность (ФИП:  $M = 9,4$ ;  $s = 0,4$ ) фагоцитов морской свинки (Таблица 3) в отношении *Y. pestis* subsp. *altaica* И-2359 ( $pYR^+pYV^+pYT^+$ ). Наименьшие значения индекса поглощения ( $M = 4,7$ ;  $s = 0,5$ ) выявлены у фагоцитов, примированных *Y. pestis* subsp. *pestis* И-2638

(pYP<sup>+</sup>pYV<sup>+</sup>pTP33<sup>+</sup>pYT<sup>+</sup>), что, на наш взгляд, может быть связано с наличием в геноме штамма, выделенного в Тувинском природном очаге чумы, pTP33, опосредованно влияющей на ингибирование механизмов фагоцитоза.

В настоящее время значение этой криптической плазмиды в определении биологических свойств чумного микроба до конца не выяснено. Высказано предположение, что плазида pTP33 является продуктом рекомбинационного контративного взаимодействия pYP и pYT *Y. pestis* [4, 121].

Таблица 3 – Поглотительная способность фагоцитов морской свинки

Штаммы	Плазмидный состав	ФИП (%)
<i>Y. pestis subsp. altaica</i> И-2948	pYP <sup>-</sup> pYV <sup>+</sup> pYT <sup>+</sup>	7,0 ± 0,7
<i>Y. pestis subsp. altaica</i> И-2948/3	pYP <sup>-</sup> pYV <sup>-</sup> pYT <sup>+</sup>	6,8 ± 0,8
<i>Y. pestis subsp. altaica</i> И-2359	pYP <sup>+</sup> pYV <sup>+</sup> pYT <sup>+</sup>	9,2 ± 0,9
<i>Y. pestis subsp. pestis</i> И-2638	pYP <sup>+</sup> pYV <sup>+</sup> pTP33 <sup>+</sup> pYT <sup>+</sup>	4,7 ± 0,5
<i>Y. pestis subsp. pestis</i> И-3480	pYP <sup>-</sup> pYV <sup>-</sup> pTP33 <sup>+</sup> pYT <sup>+</sup>	7,6 ± 0,5
<i>Y. pestis subsp. pestis</i> И-3479	pYP <sup>+</sup> pYV <sup>-</sup> pTP33 <sup>+</sup> pYT <sup>+</sup>	7,1 ± 0,3
<i>Y. pestis subsp. pestis</i> И-3560	pYP <sup>+</sup> pYV <sup>+</sup> pTP33 <sup>+</sup> pYT <sup>+</sup>	4,6 ± 0,4
<i>Y. pestis subsp. altaica</i> И-2696	pYP <sup>-</sup> pYV <sup>+</sup> pYT <sup>+</sup>	6,9 ± 0,5

В результатах проведенных опытов показаны различия в адгезивной активности штаммов чумного микроба с разным плазмидным составом, выделенных в Горно-Алтайском и Тувинском природных очагах. Штаммы чумного микроба разных подвидов, отличающиеся по плазмидному профилю, в частности отсутствию одной из плазмид (pYP, pYV), обладают низкой адгезивной активностью, тем не менее, поглотительная способность фагоцитов лабораторных животных в отношении этих штаммов в 1,5-2,0 раза выше. Можно предположить, что важную роль в этих процессах играет плазида кальцийзависимости, которая может обуславливать способность бактерий вирулентных штаммов ингибировать активность клеток системы мононуклеарных фагоцитов. Вероятно, плазида пестициногенности также может опосредовано участвовать в этом процессе [135]. Полу-

ченые в ходе исследования данные указывают, что штаммы, утратившие плазмиды pYP и pYV, обладают низкими показателями адгезивной активности по сравнению с *Y. pestis* subsp. *pestis* И-2638 и *Y. pestis* subsp. *pestis* И-3560 с полным набором плазмид (pYP<sup>+</sup>pYV<sup>+</sup>pTP33<sup>+</sup>pYT<sup>+</sup>).

Выявленные в ходе экспериментов данные о различиях в поглотительной способности ПМ в отношении *Y. pestis* subsp. *altaica* И-2948/3, *Y. pestis* subsp. *altaica* И-2359, *Y. pestis* subsp. *pestis* И-3479, *Y. pestis* subsp. *pestis* И-3480 по сравнению с *Y. pestis* subsp. *pestis* И-2638 и *Y. pestis* subsp. *pestis* И-3560, вероятно обусловлены их плазмидным профилем, в частности наличием pYP, pYV или pTP33.

Данное обстоятельство, на наш взгляд, может опосредованно влиять на ингибирование механизмов фагоцитоза.

### **3.1.3 Супероксиддисмутазная, глюкозо-6-фосфатдегидрогеназная и перекись разрушающая активности *Y. pestis* с разным плазмидным составом**

В трансмиссии возбудителя чумы *Y. pestis* ключевую роль играют паразитирующие на грызунах блохи. В отношении млекопитающих чумной микроб является факультативным внутриклеточным паразитом, способным персистировать в фагоцитирующих клетках. Проникая внутрь фагоцитов, микроб подвергается воздействию факторов противомикробной защиты. Одной из первых реакций, индуцируемых при фагоцитозе, является так называемый «окислительный взрыв». В основе последнего лежит цепь ферментативных реакций, приводящих к образованию супероксиданиона ( $O^{-2}$ ) и перекиси водорода ( $H_2O_2$ ). Эти токсичные продукты окислительного метаболизма фагоцитов обладают повреждающим действием в отношении жизненно важных молекул и структур микроорганизма. Антиоксидантная система патогенных бактерий нейтрализует активные формы кислорода (АФК)  $O^{-2}$  и  $H_2O_2$ , образующиеся при кислородзависимом фагоцитозе, а также в результате эндогенных окислительно-восстановительных реакций. АФК и перекись водорода образуются у всех аэробов и факультативных анаэробов, растущих в аэробных условиях [27, 191].

В антиоксидантную систему микроорганизмов входят супероксиддисмутазы (СОД), превращающие супероксиданион в перекись водорода, каталазы, расщепляющие ее до молекулярного кислорода и воды, а также пероксидазы, окисляющие органические субстраты при помощи  $H_2O_2$ . Субстраты пероксидаз также входят в антиоксидантную систему микроорганизмов [65].

Показано, что чумной микроб проявляет супероксиддисмутазную активность. Н.А. Видяева с соавторами (2008) исследовали супероксиддисмутазу нескольких штаммов возбудителя чумы с разным плазмидным составом. Показано, что эти штаммы продуцировали только одну форму супероксиддисмутазы с одинаковой электрофоретической подвижностью и не различались между собой по степени ее активности, что позволило сделать вывод о независимости этого признака от плазмидного состава [123].

У возбудителя чумы обнаружено несколько функциональных протеинов, обладающих каталазной и/или пероксидазной активностью. Показано, что некоторые из них непосредственно связаны со способностью патогена выживать внутри иммунокомпетентных клеток [114, 123, 166].

В 1993 г. идентифицирован секретируемый белок KatY, обладающий каталазной и пероксидазной активностью. Экспрессия этого белка происходит при 37 °С или в  $Ca^{2+}$ -дефицитной среде, а его активность в экстрактах клеток *Y. pestis* составляет менее 10 % от общей перекись разрушающей активности. Авторы установили, что протеин KatY является одним из термоиндуцибельных антигенов возбудителя чумы, ранее известным как антиген 5 или E (этот белок перекрестно реагировал с антителами, полученными к антигену 5) [193]. KatY обнаруживали как в цитоплазматической, так и периплазматической фракциях чумного микроба. Позже было показано, что детерминанта KatY локализована на хромосоме, а его экспрессия может быть индуцирована также экзогенной  $H_2O_2$  [192]. Несмотря на то, что  $H_2O_2$  и температурный режим (37 °С) являются основными элементами фаго-лизосомальной микросреды, пока не получено весомых доказательств доминирующей роли KatY в механизме устойчивости *Y. pestis* к фагоцитарному «окис-



лительному взрыву», поскольку делеционный мутант KatY высоко вирулентен для мышей [166, 192, 212].

В отличие от KatY, экспрессия консервативной для многих микроорганизмов монофункциональной каталазы KatA изменяется по фазам роста культуры *Y. pestis* и имеет ключевое значение для традиционной физиологической роли в механизме устойчивости микробной клетки к экзогенной перекиси водорода [166].

С. Р. Саямов с соавторами (2008) охарактеризовал внеклеточную несекретируемую каталазу *Y. pestis*, которая неспецифически сорбируется на наружной мембране бактерий [114]. Максимальная экспрессия этого фермента происходит при 28 °С, в связи с чем автор предположил, что данная каталаза способствует устойчивости возбудителя к летальному действию H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> фагоцитов непосредственно после заражения макроорганизма блохами. По мнению авторов, на более поздних сроках инфекционного процесса главную роль в защите микроба осуществляют секретируемые каталазы, экспрессируемые при 37 °С [114].

Поскольку нейтрализация перекиси водорода бактериальными клетками может быть результатом работы совокупности антиоксидантных ферментов (каталаз и пероксидаз), в настоящей работе будет использовано понятие «общая перекись разрушающая активность».

Цель на данном этапе исследований состояла в изучении общей супероксиддисмутазной и перекись разрушающей активности *Y. pestis* с разным плазмидным составом.

Все культуры *Y. pestis*, взятые для исследования, выращивали на агаре Хоттингера при 28 °С 48 часов. Из полученных агаровых культур готовили взвесь 10<sup>9</sup> микробных клеток (м.к.) в фосфатном буфере, содержащем 0,05 М ЭДТА (рН – 7,8 для определения супероксиддисмутазной активности и рН – 7,0 для определения общей перекись разрушающей активности).

Все манипуляции с культурами *Y. pestis* проводили в боксе микробиологической безопасности III класса в соответствии с СП 1.3.3118-13 [117].

С целью создания условий, моделирующих окислительный стресс, микробную взвесь инкубировали с  $H_2O_2$  в концентрации 0,5 мМ 24 часа.

В ходе исследований определены различия между штаммами по активности супероксиддисмутазы (Рисунок 3). Несмотря на то, что в отдельных случаях указанные различия не были достоверными, выявлена некоторая закономерность. Так, при сравнении активности супероксиддисмутазы штамма *Y. pestis* subsp. *pestis* И-2638 ( $pY^+pYV^+pYT^+pTP33^+$ ), выделенного в Тувинском природном очаге, и его изогенного варианта *Y. pestis* subsp. *pestis* И-3479 ( $pY^+pYV^-pYT^+pTP33^+$ ), лишённого плазмиды  $pYV^-$  достоверных различий по активности супероксиддисмутазы не установлено.

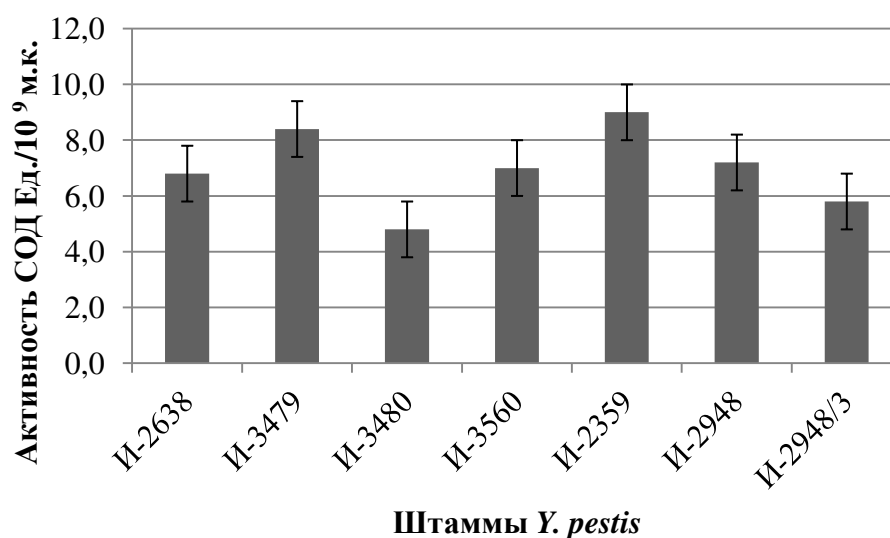


Рисунок 3 – Супероксиддисмутазная активность чумного микроба с разным плазмидным составом

Однако, у последнего штамма активность супероксиддисмутазы существенно выше, чем у другого селекционного штамма *Y. pestis* subsp. *pestis* И-3480 ( $pY^-pYV^-pYT^+pTP33^+$ ), также полученного от исходного штамма И-2638. У штаммов, выделенных в Горно-Алтайском природном очаге, достоверные различия по активности супероксиддисмутазы обнаружены только между *Y. pestis* subsp. *pestis* И-3560 ( $pY^+pYV^+pYT^+pTP33^+$ ), обладающим полным набором плазмид, характерным для Тувинского природного очага и селекционным *Y. pestis* subsp. *altaica*

И-2948/3 (pYP<sup>-</sup>pYV<sup>-</sup>pYT<sup>+</sup>). У первого этот показатель был существенно выше, чем у второго. В целом, на основании полученных данных сложно сделать выводы о роли какой-либо из плазмид в активности супероксиддисмутазы чумного микроба. Это заключение подтверждают данные других авторов, которые показали, что супероксиддисмутазная активность является термоиндуцибельным признаком и не связана с плазмидным составом [123, 126]. Тем не менее, выводы о роли плазмид в активности супероксиддисмутазы *Y. pestis* можно будет сделать после более детального исследования с использованием в качестве объектов бесплазмидных и одноплазмидных штаммов.

У всех взятых в исследование штаммов чумного микроба выявлена высокая общая перекись разрушающая активность (ОПРА). Способность *Y. pestis* разрушать H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> хорошо изучена. Однако, такие исследования, как правило, ограничиваются качественным определением перекись разрушающей активности. Опубликованные работы, посвященные количественной оценке этого показателя у штаммов *Y. pestis* с разным плазмидным составом, встречаются редко. Также немногочисленны и противоречивы сведения о корреляционной зависимости каталазной активности от вирулентности чумного микроба [123, 166, 192, 212].

В отношении ОПРА нами обнаружены различия между исследованными штаммами, которые можно представить в следующем виде (Рисунок 4).

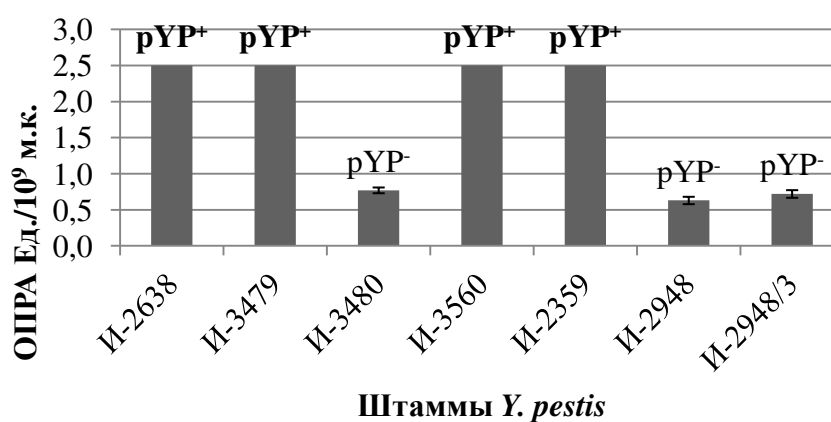


Рисунок 4 – Общая перекись разрушающая активность *Y. pestis* с разным плазмидным составом

У штаммов *Y. pestis*, которые лишены плазмиды рУР (6 мДа) этот показатель как минимум в 3 раза ниже, чем у штаммов, в геноме которых присутствует эта плазида. Следует заметить, что максимальное значение общей перекись разрушающей активности у штаммов, обладающих рУР, превышает порог чувствительности использованного метода, что не позволяет судить о реальной величине вышеуказанных отличий. Известными генетическими элементами рУР, ассоциированными с вирулентностью, являются детерминантами продукции пестицина, фибринолизина и плазмокоагулазы. Каких-либо сведений, свидетельствующих в пользу участия этой плазмиды в общей антиоксидантной активности чумного микроба обнаружить не удалось. Важно отметить, что антиоксидантный потенциал микроорганизмов складывается из экспрессии многих ферментных систем. Установить вклад каждой из них в общую активность возможно только при помощи более сложных и трудоемких методов, не позволяющих исследовать одновременно несколько штаммов. Модифицированные же нами методы позволяют одновременно исследовать до 10 штаммов и проводить предварительную экспресс оценку их антиоксидантного потенциала.

Для дифференциации биохимических свойств штаммов алтайского и основного подвидов рядом исследователей предложен тест для определения Г6ФДГ активности чумного микроба [33].

Известно, что чумной микроб, в зависимости от его фенотипических свойств, обладает разным уровнем Г6ФДГ активности. Так, у *Y. pestis* subsp. *pestis* И-2638 содержание этого фермента в среднем в 2,0-2,3 раза ниже по сравнению с остальными клетками чумного микроба ( $P = 0,017$ ), взятых в эксперимент. У двух изогенных вариантов вирулентного штамма *Y. pestis* subsp. *pestis* И-2638 – *Y. pestis* subsp. *pestis* И-3479 и *Y. pestis* subsp. *pestis* И-3480 и *Y. pestis* subsp. *altaica* (И-2948 и И-2948/3) существенных различий Г6ФДГ активности не выявлено (Таблица 4).

Таблица 4 – Глюкозо-6-фосфатдегидрогеназная активность *Y. pestis*

Штаммы	Плазмидный состав	Уровень активности Г6ФДГ
<i>Y. pestis subsp. altaica</i> И-2948	pYP <sup>-</sup> pYV <sup>+</sup> pYT <sup>+</sup>	0,30 ± 0,07
<i>Y. pestis subsp. altaica</i> И-2948/3	pYP <sup>-</sup> pYV <sup>-</sup> pYT <sup>+</sup>	0,32 ± 0,05
<i>Y. pestis subsp. altaica</i> И-2359	pYP <sup>+</sup> pYV <sup>+</sup> pYT <sup>+</sup>	0,34 ± 0,09
<i>Y. pestis subsp. pestis</i> И-2638	pYP <sup>+</sup> pYV <sup>+</sup> pTP33 <sup>+</sup> pYT <sup>+</sup>	0,15 ± 0,03
<i>Y. pestis subsp. pestis</i> И-3480	pYP <sup>-</sup> pYV <sup>-</sup> pTP33 <sup>+</sup> pYT <sup>+</sup>	0,32 ± 0,07
<i>Y. pestis subsp. pestis</i> И-3479	pYP <sup>+</sup> pYV <sup>-</sup> pTP33 <sup>+</sup> pYT <sup>+</sup>	0,30 ± 0,06
<i>Y. pestis subsp. pestis</i> И-3560	pYP <sup>+</sup> pYV <sup>+</sup> pTP33 <sup>+</sup> pYT <sup>+</sup>	0,14 ± 0,01
<i>Y. pestis subsp. altaica</i> И-2696	pYP <sup>-</sup> pYV <sup>+</sup> pYT <sup>+</sup>	0,29 ± 0,06

Результаты проведенного эксперимента свидетельствуют о наличии корреляционной связи между каталитической способностью Г6ФДГ чумного микроба и его адгезивной активностью ( $r = - 0,85$ ). У вирулентного штамма *Y. pestis* И-2638 при наличии низкой активности Г6ФДГ отмечается высокая адгезивная способность. Показано, что при повышении показателей Г6ФДГ происходит заметное снижение способности чумного микроба фиксироваться на поверхности эритроцита. Предположительно, изменения в адгезивных и ферментативных свойствах *Y. pestis* связаны с особенностями его плазмидного профиля.

Материалы, полученные в ходе исследования, подтверждают данные других авторов [189] о низкой способности вирулентных штаммов экспрессировать активную форму Г6ФДГ из-за миссенс-мутаций (замена пролина на серин в аминокислотной позиции 155).

Таким образом, на основании полученных в ходе экспериментов данных показано, что супероксиддисмутазная активность исследованных штаммов *Y. pestis*, выделенных в Горном-Алтайском и Тувинском очагах, и их изогенных субкультур не зависит от плазмидного состава. Все изученные штаммы чумного микроба и их изогенные варианты, отличающиеся по плазмидному профилю, обладают перекисью разрушающей активностью, степень которой зависит от наличия в геноме плазмиды pYP.

### **3.2 Оценка *in vitro* состояния клеток иммунной системы морской свинки при взаимодействии с *Y. pestis* исходных и дефектных по плазмидному составу штаммов**

Известно, что патогенетическую основу взаимодействия возбудителя чумы и носителя составляет взаимосвязь микроба с фагоцитирующими клетками организма на всем протяжении инфекционного процесса. Физиологической основой клеточной защиты макроорганизма от возбудителя чумы является антимикробный потенциал фагоцитирующих клеток, определяемый действием метаболитов, содержащих активные формы кислорода, и бактерицидными неферментными катионными белками (НКБ) [19, 25, 40]. В связи с этим, изучение антимикробного потенциала фагоцитов животных к возбудителю чумы с разным плазмидным составом позволит уточнить течение чумного инфекционного процесс в естественных условиях.

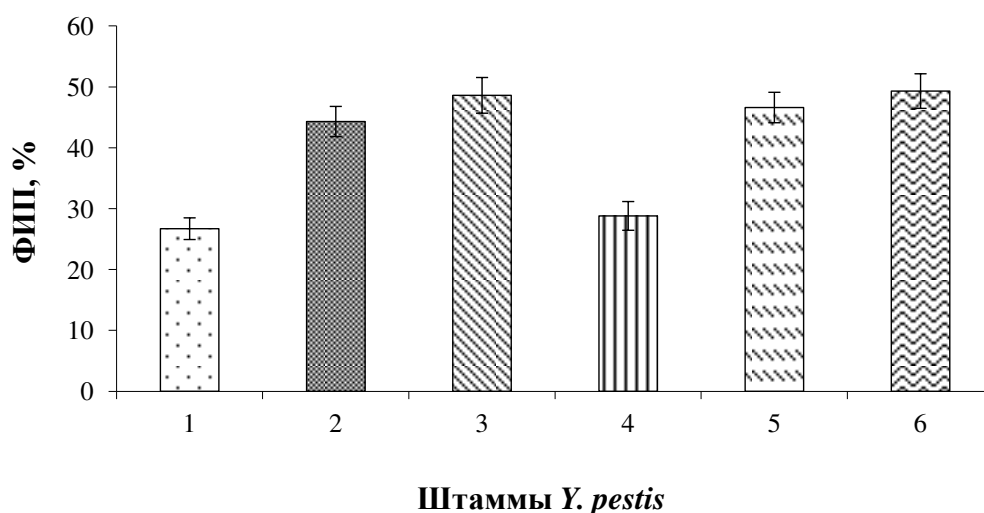
Цель исследования на данном этапе – выявить особенности фагоцитарной активности перитонеальных макрофагов и полиморфноядерных лейкоцитов морской свинки в условиях *in vitro* при взаимодействии с *Y. pestis* с разным плазмидным составом.

#### **3.2.1 Поглотительная способность фагоцитов при взаимодействии с *Y. pestis***

Фагоцитарную активность перитонеальных макрофагов (ПМ) и полиморфноядерных лейкоцитов (ПЯЛ) оценивали по поглотительной способности фагоцитов (фагоцитарный индекс поглощения, ФИП, %), состоянию кислородзависимого метаболизма в НСТ-тесте (индекс стимуляции в %, ИС), активности миелопероксидазы в условных единицах (МПО, у.е.), уровню содержания НКБ в единицах оптической плотности (ЕОП).

В качестве контроля и источника маркерных плазмид в работе использовали аттенуированный вакцинный штамм *Y. pestis* EV НИИИЭГ.

При изучении поглощения чумного микроба в условиях *in vitro* установлено, что этот процесс наиболее выражен у ПЯЛ ( $P < 0,05$ ) в отношении авирулентных, утративших плазмиду «вирулентности» штаммов *Y. pestis* subsp. *altaica* И-2948/3 ( $M = 48,6$ ;  $s = 0,48$ ), *Y. pestis* subsp. *pestis* И-3479 ( $M = 47,3$ ;  $s = 0,98$ ), *Y. pestis* subsp. *pestis* И-3480 ( $M = 49,3$ ;  $s = 0,34$ ), чем в случае с вирулентным штаммом *Y. pestis* subsp. *pestis* И-2638, несущим в своем геноме полный набор плазмид ( $M = 28,8$ ;  $s = 0,36$ ). Результаты исследований представлены на рисунке 5.

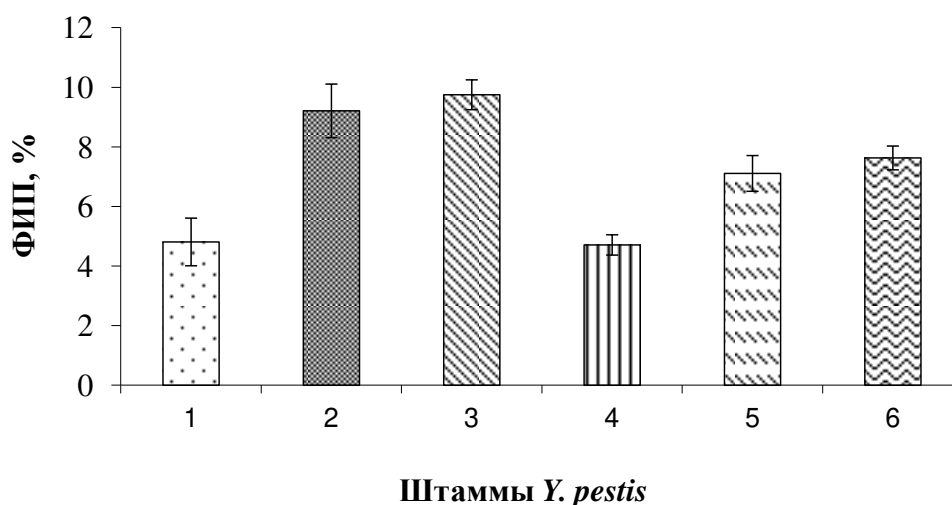


1 – *Y. pestis* subsp. *pestis* И-3560; 2 – *Y. pestis* subsp. *altaica* И-2948; 3 – *Y. pestis* subsp. *altaica* И-2948/3; 4 – *Y. pestis* subsp. *pestis* И-2638; 5 – *Y. pestis* subsp. *pestis* И-3479; 6 – *Y. pestis* subsp. *pestis* И-3480

Рисунок 5 – Поглотительная способность ПЯЛ в условиях *in vitro* (ФИП, %)

При изучении поглотительной способности перитонеальных макрофагов в результате их 30 минутного примирования чумным микробом с разным плазмидным составом обнаружена высокая поглотительная способность фагоцитов только в отношении изолята чумного микроба (*Y. pestis* subsp. *altaica* И-2948) и его деривата (*Y. pestis* subsp. *altaica* И-2948/3), выделенного в Горно-Алтайском природ-

ном очаге чумы, значения ФИП составили, соответственно ( $M = 9,41$ ;  $s = 0,38$ ) и ( $M = 9,75$ ;  $s = 0,14$ ). Как и в случае ПЯЛ, наименьшие значения индекса поглощения были у фагоцитов при контакте с *Y. pestis* subsp. *pestis* И-2638 ( $M = 4,71$ ;  $s = 0,5$ ). Результаты исследований представлены на рисунке 6.



1 – *Y. pestis* subsp. *pestis* И-3560; 2 – *Y. pestis* subsp. *altaica* И-2948; 3 – *Y. pestis* subsp. *altaica* И-2948/3; 4 – *Y. pestis* subsp. *pestis* И-2638; 5 – *Y. pestis* subsp. *pestis* И-3479; 6 – *Y. pestis* subsp. *pestis* И-3480

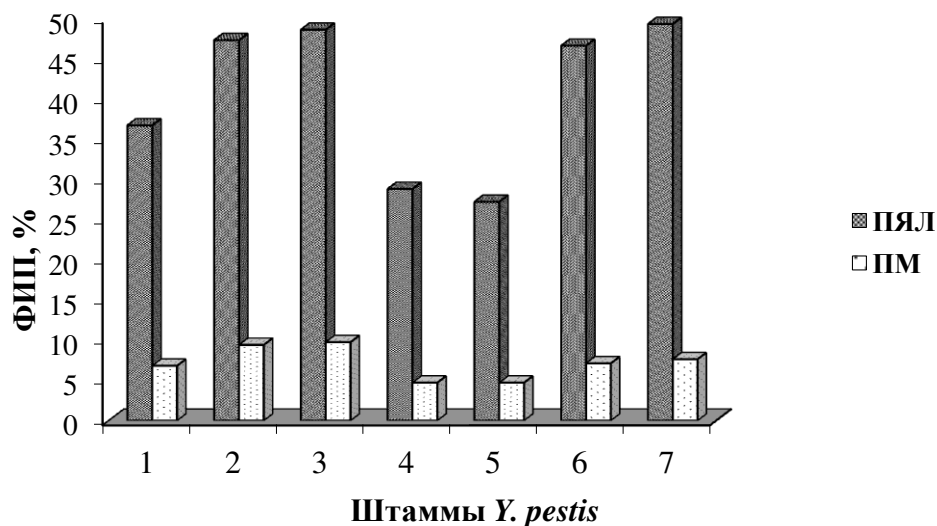
Рисунок 6 – Поглотительная способность ПМ в условиях *in vitro* (ФИП, %)

Установлено, что ПЯЛ экспериментальных животных проявляют более выраженную поглотительную способность в отношении чумного микроба по сравнению с ПМ (Рисунок 7).

Так, у ПЯЛ при контакте с алтайским штаммом *Y. pestis* subsp. *altaica* И-2948 и его изогенным вариантом *Y. pestis* subsp. *altaica* И-2948/3 ФИП был выше, чем у ПМ в 5,0; – с вакцинным штаммом *Y. pestis* EV в 5,5; – с тувинским штаммом *Y. pestis* subsp. *pestis* И-2638 и его производными *Y. pestis* subsp. *pestis* И-3479



и *Y. pestis* subsp. *pestis* И-3480 в 6,0-6,6 раза. Это явление вполне объяснимо, поскольку лейкоциты первые встречают чужеродные агенты.



1 – *Y. pestis* И-2359; 2 – *Y. pestis* subsp. *altaica* И-2948; 3 – *Y. pestis* subsp. *altaica* И-2948/3; 4 – *Y. pestis* subsp. *pestis* И-2638; 5 – *Y. pestis* subsp. *pestis* И-3560; 6 – *Y. pestis* subsp. *pestis* И-3479; 7 – *Y. pestis* subsp. *pestis* И-3480

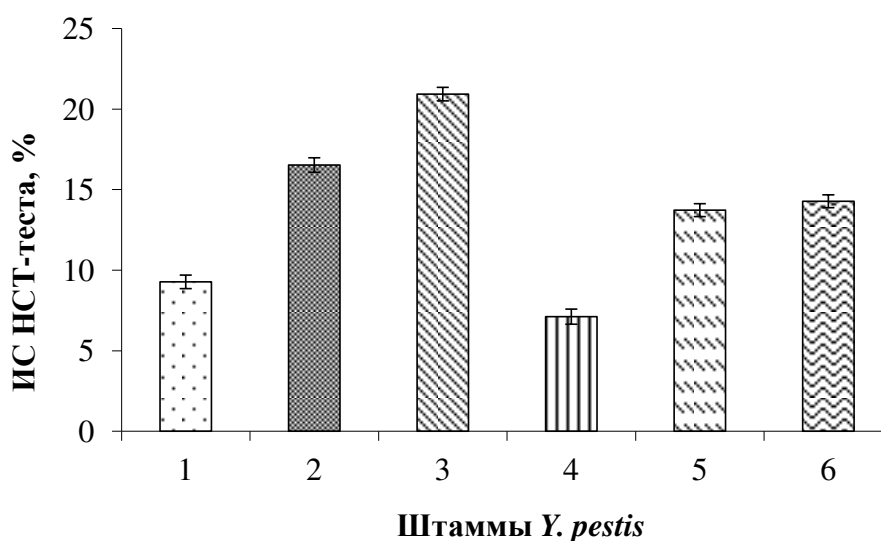
Рисунок 7 – Поглощительная способность фагоцитов в условиях *in vitro* (ФИП, %)

Таким образом, показана высокая поглощительная способность фагоцитов морских свинок *in vitro* в отношении *Y. pestis* subsp. *altaica* И-2948 (pY<sup>r</sup><sup>-</sup>pYV<sup>+</sup>pYT<sup>+</sup>). Наименьшие значения индекса поглощения выявлены у ПМ, примененных высоковирулентными штаммами *Y. pestis* subsp. *pestis* И-2638 и *Y. pestis* И-3560 (pY<sup>r</sup><sup>+</sup>pYV<sup>+</sup>pTP33<sup>+</sup>pYT<sup>+</sup>). Штамм *Y. pestis* И-2359 (pY<sup>r</sup><sup>+</sup>pYV<sup>+</sup>pYT<sup>+</sup>) по данному показателю занимал промежуточное положение, что позволяет предположить опосредованное участие плазмиды pTP33 в ингибировании механизмов фагоцитоза.

### 3.2.2 Бактерицидные механизмы фагоцитоза чумного микроба с разным плазмидным составом

Материалы, представленные на рисунке 8, указывают на незначительные отличия ИС НСТ-теста у ПМ при фагоцитозе чумного микроба разных подвидов по сравнению с контрольными значениями.

Тем не менее, наибольшие значения НСТ-теста отмечены у дериватов исходных штаммов чумного микроба с отсутствием плазмиды рYV (*Y. pestis* subsp. *altaica* И-2948/3, *Y. pestis* subsp. *pestis* И-3479, *Y. pestis* subsp. *pestis* И-3480). Минимальные значения НСТ-теста выявлены у ПМ в отношении штамма *Y. pestis* subsp. *pestis* И-2638 и *Y. pestis* subsp. *pestis* И-3560 ( $M = 9,27$ ;  $s = 0,42$ ), что вероятно, может объясняться способностью вирулентного фенотипа чумного микроба оказывать иммунодепрессивное действие.

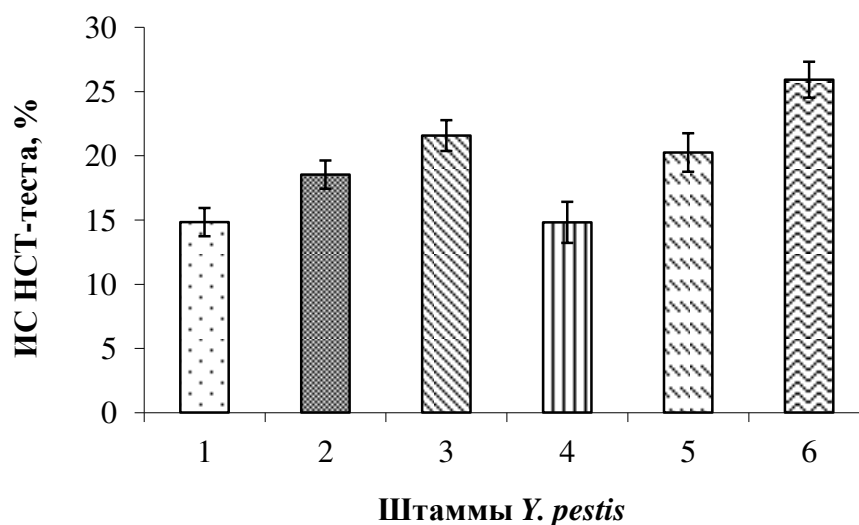


1 – *Y. pestis* subsp. *pestis* И-3560; 2 – *Y. pestis* subsp. *altaica* И-2948; 3 – *Y. pestis* subsp. *altaica* И-2948/3; 4 – *Y. pestis* subsp. *pestis* И-2638; 5 – *Y. pestis* subsp. *pestis* И-3479; 6 – *Y. pestis* subsp. *pestis* И-3480

Рисунок 8 – Влияние возбудителя чумы на показатели НСТ-теста ПМ в условиях *in vitro*

При изучении функционального состояния ПЯЛ в НСТ-тесте, также как и в случае ПМ уровень значимости различий по сравнению с контролем составили 0,0495. Между тем наибольшие значения ИС зарегистрированы у ПЯЛ в отношении штаммов чумного микроба без рYV: *Y. pestis* subsp. *pestis* И-3479 (M = 20,25; s = 0,42), *Y. pestis* subsp. *pestis* И-3480 (M = 25,92; s = 0,51), *Y. pestis* subsp. *altaica* И-2948/3 (M = 21,57; s = 0,73). По мнению ряда авторов рYV определяет пролиферацию чумного микроба в фагоцитах, блокаду и удаление активных форм кислорода, содержащихся в метаболитах фагоцитов [7, 12, 98, 141].

Результаты исследований действия возбудителя чумы на функциональную способность ПЯЛ в условиях *in vitro* по данным, полученным с помощью НСТ-теста представлены на рисунке 9.

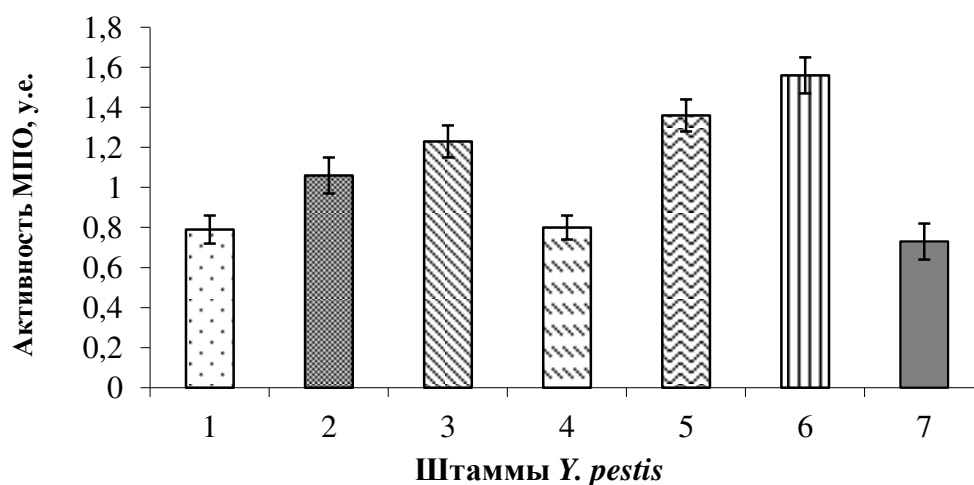


1 – *Y. pestis* subsp. *pestis* И-3560; 2 – *Y. pestis* subsp. *altaica* И-2948; 3 – *Y. pestis* subsp. *altaica* И-2948/3; 4 – *Y. pestis* subsp. *pestis* И-2638; 5 – *Y. pestis* subsp. *pestis* И-3479; 6 – *Y. pestis* subsp. *pestis* И-3480

Рисунок 9 – Влияние возбудителя чумы на показатели НСТ-теста ПЯЛ в условиях *in vitro*

Установлено, что стимуляция активности МПО по сравнению с контролем происходит при взаимодействии лейкоцитов с *Y. pestis* subsp. *pestis* И-3480 в 2,1; с *Y. pestis* subsp. *altaica* И-2948/3 – в 1,9; *Y. pestis* subsp. *altaica* И-2948 – в 1,7 раза.

Значения показателя активности МПО у ПЯЛ при взаимодействии в условиях *in vitro* с вирулентными штаммами *Y. pestis* subsp. *pestis* И-2638 и *Y. pestis* subsp. *pestis* И-3560 оставались на уровне контрольных (Рисунок 10).



1 – *Y. pestis* subsp. *pestis* И-3560; 2 – *Y. pestis* subsp. *altaica* И-2948; 3 – *Y. pestis* subsp. *altaica* И-2948/3; 4 – *Y. pestis* subsp. *pestis* И-2638; 5 – *Y. pestis* subsp. *pestis* И-3479; 6 – *Y. pestis* subsp. *pestis* И-3480; 7 – контроль (интактные клетки)

Рисунок 10 – Влияние возбудителя чумы на активность МПО ПЯЛ в условиях *in vitro*

Таким образом, в условиях *in vitro* показаны различия в характере воздействия бактерий штаммов *Y. pestis* на кислородзависимые бактерицидные системы фагоцитов (ПЯЛ, ПМ). В ходе экспериментов установлено повышение показателей фагоцитарной и бактерицидной активности клеток системы мононуклеарных фагоцитов (ФИП, НСТ-тест, МПО) в отношении *Y. pestis* И-2948/3, *Y. pestis* И-3479, *Y. pestis* И-3480 по сравнению с *Y. pestis* И-2638 и *Y. pestis* И-3560, что может быть связано с утратой плазмид рYV и рYР. Увеличение в 5,0–7,0 раз (P <

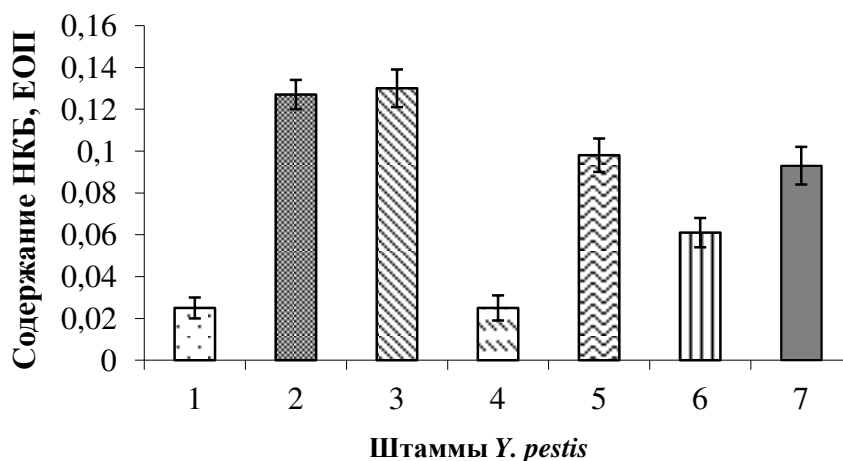
0,05) эффекторного потенциала полиморфноядерных лейкоцитов (ПЯЛ) при контакте с чумным микробом по сравнению с перитонеальными макрофагами свидетельствует о более интенсивной активации раннего индуцибельного ответа этих клеток.

Тем не менее, *Y. pestis* И-2638 и его изогенные дериваты могут ингибировать высвобождение неферментных катионных белков из гранул ПЯЛ и приводить к снижению их бактерицидного действия.

На следующем этапе исследований нами предпринята попытка изучения влияния плазмид на кислороднезависимый (КНЗ) антимикробный потенциал фагоцитов (ПЯЛ).

Показано, что только алтайский штамм *Y. pestis* subsp. *altaica* И-2948 ( $M = 0,127$ ;  $s = 0,007$ ) и его изогенный вариант *Y. pestis* subsp. *altaica* И-2948/3 ( $M = 0,130$ ;  $s = 0,002$ ) достоверно ( $P < 0,05$ ) повышают уровень содержания НКБ лейкоцитов, по сравнению с контролем ( $M = 0,093$ ;  $s = 0,005$ ). Показано, что тувинский вирулентный штамм *Y. pestis* subsp. *pestis* И-2638 и его дериваты *Y. pestis* subsp. *pestis* И-3479, *Y. pestis* subsp. *pestis* И-3480 ингибируют высвобождение НКБ из гранул фагоцитов, причем дикий тип штамма в большей степени (Рисунок 11).

Результаты проведенных исследований показали, что наибольшей поглотительной способностью обладают ПЯЛ и ПМ в отношении *Y. pestis* subsp. *altaica* И-2948/3, *Y. pestis* subsp. *pestis* И-3479, *Y. pestis* subsp. *pestis* И-3480, что вероятно обусловлено отсутствием плазмиды  $pYV$ . Наименьшие показатели были у фагоцитов в отношении *Y. pestis* subsp. *pestis* И-2638 и *Y. pestis* И-3560. Аналогичная тенденция отмечена и при оценке состояния бактерицидных кислородзависимых систем фагоцитов (НСТ-тест, МПО). Сравнительный анализ фагоцитарной активности ПЯЛ и ПМ показал, что лейкоциты обладают более выраженным эффекторным потенциалом, чем макрофаги, что вероятно объясняется наличием у них более мощных антимикробных систем.



1 – *Y. pestis* И-3560; 2 – *Y. pestis* subsp. *altaica* И-2948; 3 – *Y. pestis* subsp. *altaica* И-2948/3; 4 – *Y. pestis* subsp. *pestis* И-2638; 5 – *Y. pestis* subsp. *pestis* И-3479; 6 – *Y. pestis* subsp. *pestis* И-3480; 7 – контроль (интактные клетки)

Рисунок 11 – Влияние чумного микроба на кислороднезависимые бактерицидные системы ПЯЛ

Установлено, что тувинский штамм *Y. pestis* subsp. *pestis* И-2638 с полным набором плазмид ( $pYp^+pYV^+pTP33^+pYT^+$ ) и его изогенные дериваты ингибируют высвобождение НКБ из гранул ПЯЛ, что приводит к снижению их антимикробного кислороднезависимого действия.

Таким образом, в результате проведенных в условиях *in vitro* экспериментов показаны различия в характере действия на кислородзависимые и кислороднезависимые бактерицидные системы фагоцитов (ПЯЛ, ПМ) штаммов, выделенных в Горно-Алтайском и Тувинском природных очагах, различающихся по плазмидному составу и вирулентности для лабораторных животных. Разная степень действия тестируемых штаммов чумного микроба на бактерицидные системы фагоцитов, по-видимому обусловлена их плазмидным составом. Немаловажную, на наш взгляд роль в этих процессах играет отсутствие плазмиды кальцийзависимости, которая может обуславливать способность вирулентных штаммов ингибиро-

вать и утилизировать действие активных форм кислорода, образуемых в процессе респираторного взрыва. Вероятно, плаزمиды пестициногенности также могут опосредованно влиять на антимикробные свойства фагоцитов, поскольку изогенные варианты тувинского штамма, утратившие эту плазмиду не способны противостоять киллерному воздействию полиморфноядерных лейкоцитов.

Кроме того, нами показано, что возбудитель *Y. pestis*, обладающий тремя основными плазмидами (pYP, pYV, pYT), вызывает у животных острую генерализованную форму заболевания, которая, как правило, заканчивается летальным исходом. Утрата видоспецифических плазмид, в частности, плазмид вирулентности (pYV и pYP) замедляет развитие инфекционного процесса и вызывает гибель экспериментальных животных на более поздние сроки [101]. Полученные нами данные дополняют сведения о патогенезе инфекционного процесса, вызванного штаммами чумного микроба с соответствующим набором плазмид.

### 3.3 Популяционный состав клеток крови и перитонеальной жидкости лабораторных животных при экспериментальной чумной инфекции

#### 3.3.1 Динамика изменения популяционного состава мононуклеарных клеток перитонеальной жидкости белых мышей

Экспериментальной моделью в опытах служили 175 беспородных, но стандартных по условиям содержания и весу (18-20 г) белых мышей обоих полов. Животных выводили из эксперимента в соответствии с «Правилами лабораторной практики» [108].

Интактные белые мыши были разделены на шесть опытных и одну контрольную группы по 25 особей. Животным опытных групп вводили *Y. pestis* в концентрации  $1 \cdot 10^6$  м.к. в объеме 0,5 мл интраперитонеальным способом. Первой группе животных (I группа) вводили выращенную при температуре 28 °С двухсуточную культуру *Y. pestis* subsp. *pestis* И-2638 и *Y. pestis* И-3560, II группе – *Y. pestis* subsp. *pestis* И-3479, III группе – *Y. pestis* subsp. *pestis* И-3480, IV группу животных заражали референтным Горно-Алтайским штаммом *Y. pestis* subsp. *altaica* И-2359, V группе вводили *Y. pestis* subsp. *altaica* И-2948, а VI опытной группе животных – селекционный штамм *Y. pestis* subsp. *altaica* И-2948/3. Контроль скрининга плазмид осуществлялся как перед проведением экспериментов, так и в процессе исследований.

Забор материала от экспериментальных животных (перитонеальная жидкость) производили через 30, 60, 90, 120 и 180 минут. Проводили подсчет общего числа ядерных клеток в 1 мл перитонеальной жидкости в фиксированных препаратах, окрашенных стандартными методами [134]. Для бактериологического анализа кровь из сердца и перитонеальную жидкость (по 0,1 мл) засеивали на твердую питательную среду (агар Хоттингера, рН 7,2).

Степень активизации тучных клеток (ТК) оценивали по индексу дегрануляции тучных клеток (ИДТК) – процентное соотношение дегранулированных тучных клеток к их общему числу [26, 61].



Общее количество клеток в перитонеальной жидкости у интактных животных составляет  $4,3 \pm 0,9 \cdot 10^3$  в  $1 \text{ см}^3$ , при этом макрофаги являются преобладающим клеточным типом и составляют  $60,5 \pm 5,6 \%$  от общего числа клеток, а на долю лимфоцитов приходится  $17,0 \pm 2,8 \%$ ;  $5,5 \pm 0,8 \%$  – клетки мезотелия и другие клеточные элементы.

У инфицированных белых мышей наблюдается фазность в изменении общего количества ядерных клеток. У животных, зараженных вирулентным штаммом *Y. pestis* subsp. *pestis* И-2638, через 30 мин общее число ядерных клеток резко возрастает и достигает в среднем  $1,5 \pm 0,4 \cdot 10^4$  в  $1 \text{ см}^3$ , что превышает показатели у интактных животных в 3,4 раза. К 60 минутам исследования показатели снижаются до значений у интактных животных ( $0,44 \pm 0,01$ ). Цитологическая картина перитонеальной жидкости имеет четкую взаимосвязь с заражающей культурой. У животных I опытной группы через 30 мин после инфицирования отмечено увеличение количества лимфоцитов в 4,0 раза по сравнению с контролем (интактные животные) за счет резкого снижения числа моноцитов. Увеличение показателя содержания лимфоцитов в перитонеальной жидкости выявлены во все сроки наблюдения. В перитонеальной жидкости белых мышей, инфицированных как *Y. pestis* subsp. *pestis* И-2638, так и *Y. pestis* И-3560 через 120 минут от начала эксперимента зарегистрировано увеличение сегментоядерных нейтрофилов в среднем в 2,5 раза по сравнению с контролем ( $P < 0,05$ ) и незначительно – палочкоядерных нейтрофилов. На последнем сроке исследования в мазках перитонеальной жидкости выявляется большое количество фибробластов, агрегация лимфоцитов и большое количество делящихся клеток.

У белых мышей, зараженных *Y. pestis* subsp. *altaica* И-2359, *Y. pestis* subsp. *pestis* И-3479 и *Y. pestis* subsp. *altaica* И-2948/3, через 30 мин после начала эксперимента статистически значимых различий по сравнению с контролем не выявлено. К 180 мин – количество ядерных клеток в перитонеальном экссудате превосходит показатели в контроле в 2,8 ( $P < 0,01$ ), 1,9 ( $P < 0,05$ ) и 1,5 раза соответственно. При введении животным *Y. pestis* subsp. *pestis* И-3480 и *Y. pestis* subsp. *altaica* И-2948 через 30 мин отмечается повышение общего числа ядерных клеток

с последующим снижением (120 мин) до уровня контроля, и к 180 мин показатель вновь увеличивается.

При просмотре мазков перитонеальной жидкости у животных всех опытных групп регистрируется пролиферация лимфоцитов, гистиоцитов, увеличение количества эозинофилов, ТК, плазмоцитов, клеток мезотелия и фибробластов.

Оценка морфологических свойств базофилов, их количество и функциональная активность представляют интерес при исследовании клеточного состава перитонеальной жидкости инфицированных животных.

Установлено, что у опытных белых мышей отмечается фазность в изменении количественного состава ТК перитонеальной жидкости (Таблица 5).

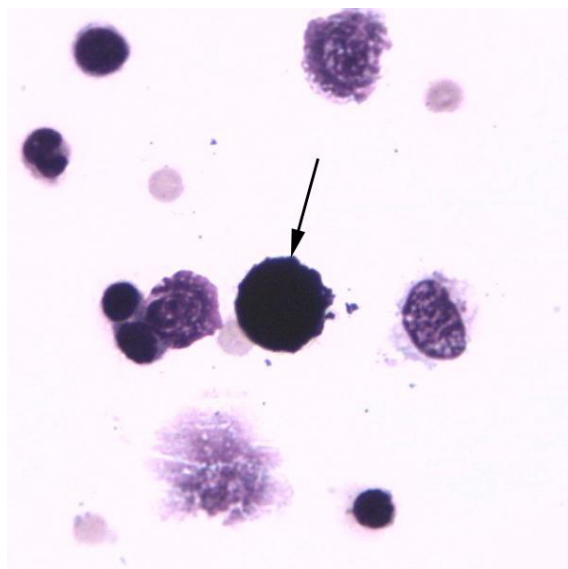
Таблица 5 – Показатели содержания тучных клеток в перитонеальной жидкости мышей, инфицированных *Y. pestis*, %

Штаммы	Сроки наблюдения, мин				
	30	60	90	120	180
<i>Y. pestis</i> И-3479	3,0 ± 0,1	4,5 ± 0,3*	4,8 ± 0,2*	3,5 ± 0,4*	5,0 ± 0,4*
<i>Y. pestis</i> И-3480	2,5 ± 0,1	4,0 ± 0,1*	4,0 ± 0,5*	3,0 ± 0,2	4,5 ± 0,6*
<i>Y. pestis</i> И-2948	2,6 ± 0,3	1,6 ± 0,1*	1,8 ± 0,1	1,3 ± 0,1*	2,2 ± 0,2
<i>Y. pestis</i> И-2948/3	2,0 ± 0,1	3,0 ± 0,3	2,0 ± 0,1	2,0 ± 0,3	2,5 ± 0,5
<i>Y. pestis</i> И-2996	3,5 ± 0,2*	4,5 ± 0,2*	4,5 ± 0,3*	3,5 ± 0,2	3,0 ± 0,1
<i>Y. pestis</i> И-2359	2,5 ± 0,1	2,0 ± 0,1	2,0 ± 0,1	4,0 ± 0,2*	3,0 ± 0,2
<i>Y. pestis</i> И-2638	3,8 ± 0,2*	8,0 ± 0,4*	4,5 ± 0,3*	2,5 ± 0,1	8,5 ± 0,7*
<i>Y. pestis</i> И-3560	4,0 ± 0,5*	7,0 ± 0,1*	4,0 ± 0,2*	2,5 ± 0,5	8,0 ± 0,1*
Контроль (интактные)	2,5 ± 0,1				

Примечание \* – достоверность данных по отношению к контролю  $P < 0,05$

В перитонеальной жидкости мышей, инфицированных штаммами *Y. pestis* с полным набором плазмид (*Y. pestis* И-2638 и *Y. pestis* И-3560) установлено повышение содержания ТК во все сроки наблюдения по сравнению с контролем в 1,5-2,6 раза ( $P < 0,05$ ). Часть ТК представлены интестинальными – незрелыми формами (Рисунок 12). Атипичные ТК составили  $21,0 \pm 1,8$  % от общего числа ТК в экс-

перименте от 30 мин до 60 мин, к последним срокам наблюдения данные показатели возрастали до  $25,2 \pm 2,1$  %.

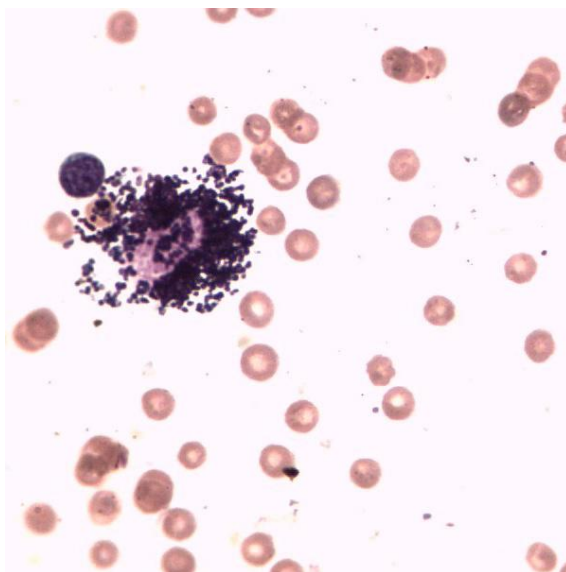


Окраска по Романовскому-Гимза, увел.100×100

Рисунок 12 – Интестинальные тучные клетки перитонеальной жидкости белой мыши, инфицированной *Y. pestis* subsp. *pestis* И-2638

Атипичные ТК обладают минимальным функциональным потенциалом и имеют значительно меньшие размеры. Диаметр таких клеток составляет 6,8-8,6 мкм, что в среднем в 2,3 раза меньше ( $P < 0,05$ ), чем у типичных ТК. Показано, что в перитонеальной жидкости белых мышей, зараженных *Y. pestis* subsp. *altaica* И-2359 ( $pYR^+pYV^+pYT^+$ ) в отличие от мышей, инфицированных штаммами с полным набором плазмид атипичных ТК значительно меньше. Кроме того в период наблюдения с 120 до 180 мин после заражения отмечаются единичные интестинальные тучные клетки, а у животных других опытных групп (экспериментальные животные, инфицированные штаммами с не полным набором плазмид), атипичные ТК не выявлялись.

В целом, исследование показало, что активизация системы ТК отражает общую адаптивную перестройку организма в ответ на введение антигена. Дегрануляция ТК проходит по пути цельногранулярного экзоцитоза (Рисунок 13).



Окраска по Романовскому-Гимза, увел.  $10\times 100$

Рисунок 13 – Дегрануляция тучных клеток перитонеальной жидкости белой мыши, инфицированной *Y. pestis subsp. pestis* И-2638

Функциональная активность ТК перитонеальной жидкости опытных животных имеет фазный характер. Самый высокий ИДТК отмечается у белых мышей через 60 мин после заражения штаммами с полным набором плазмид *Y. pestis subsp. pestis* И-2638 и *Y. pestis subsp. pestis* И-3560, который составляет  $3,9 \pm 0,6$  и  $3,8 \pm 0,4$ , что в среднем в 18,5 раза ( $P < 0,01$ ) выше ИДТК у интактных животных ( $0,2 \pm 0,1$ ). Отмечена тенденция к снижению этого показателя к 120 мин и достоверное повышение к 180 мин наблюдения, когда ИДТК превышает значения в контрольной группе в среднем в 4,4 раза ( $P < 0,01$ ).

У штаммов *Y. pestis subsp. pestis* И-3479 и *Y. pestis subsp. pestis* И-3480 максимальное значение индекса дегрануляции к 90 мин от начала опыта составляет

2,0 ± 0,3 и 1,3 ± 0,4 соответственно. При этом у белых мышей II группы показатели во все сроки исследования были выше, чем у животных III опытной группы. Наиболее выраженный фазный характер изменения ТК отмечается у белых мышей IV опытной группы. Максимальное значение ИДТК приходится на второй и четвертый этап исследования (60 и 120 мин), превышая значения интактных животных в 5,8 и 7,4 раза ( $P < 0,05$ ) соответственно. У особей, зараженных *Y. pestis* subsp. *altaica* И-2948/3, только на двух сроках исследования (60 и 90 мин) регистрируется увеличение дегрануляции тучных клеток в 3,6 и 2,6 раза ( $P < 0,05$ ), в другие сроки – данные статистически не достоверны. У белых мышей V опытной группы максимальное значение ИДТК приходится на второй и последний срок исследования – 1,1 и 0,9 у.е., при 0,2 у.е. в контроле.

Таким образом, развитие инфекционного процесса в первые часы (60 и 120 мин) после инокуляции возбудителя чумы зависит от его плазмидного профиля, поскольку, наиболее выраженные изменения количественного и качественного клеточного состава перитонеальной жидкости выявлены у экспериментальных животных при заражении штаммами с наличием  $pY^+pYV^+pYT^+$ .

Выявленная в ходе эксперимента фазность в изменении количественного состава тучных клеток перитонеальной жидкости, особенно у особей, зараженных вирулентным штаммом *Y. pestis* subsp. *pestis* И-2638 ( $pY^+pYV^+pTP33^+pYT^+$ ), а также наличие незрелых и атипичных форм ТК свидетельствует, по-видимому, о развитии приспособительно-компенсаторных процессов.

В целом, активизация системы тучных клеток отражает общую адаптивную перестройку организма в ответ на введение антигена.

### **3.3.2 Субпопуляционный состав клеток крови белых мышей**

Утрата одной или нескольких плазмид приводит к изменению патогенных свойств и к снижению или даже полной утрате вирулентности возбудителя, а также отражается на морфофункциональном состоянии органов иммунной системы [7, 12, 98, 141]. В связи с этим представляет интерес исследование особенностей

субпопуляционного состава клеток крови экспериментальных животных, получивших культуру чумного микроба с разным плазмидным составом.

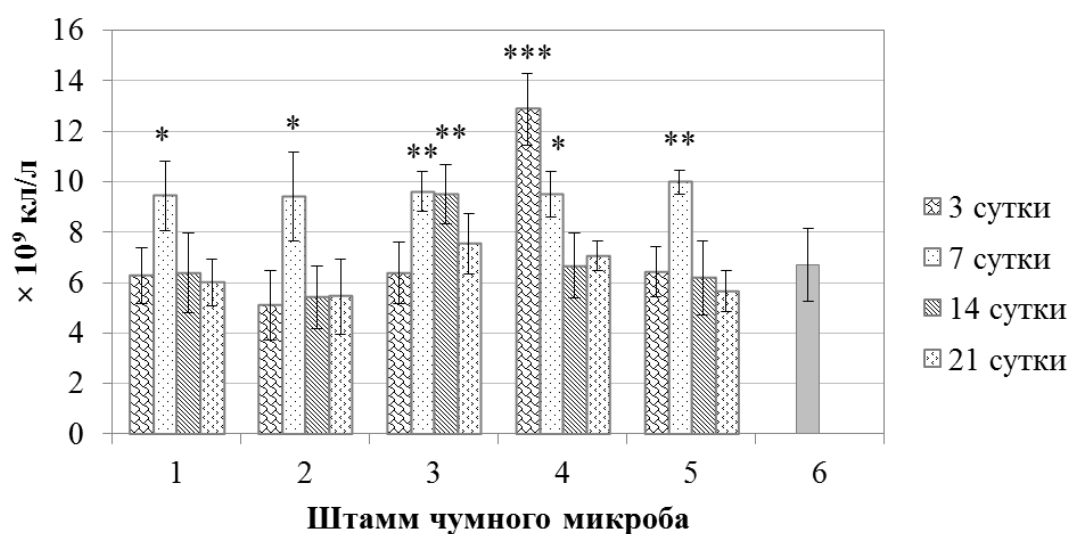
Подопытным животным подкожно вводили взвеси штаммов чумного микроба в дозе  $10^6$  м.к./0,5 мл забуференного физиологического раствора. Контролем служили белые мыши, получившие ЗФР в объеме 0,2 мл. Учет результатов проводили на 3, 7, 14 и 21 сутки. В связи с тем, что мыши, зараженные высоковирулентными штаммами чумного микроба (см. Таблица 1), гибнут на 2-3 сутки, кровь от этих животных забирала на 1, 2 и 3 сутки. Обеззараживание материала проводили с использованием формальдегида в конечной 2 % концентрации в соответствии с методическими рекомендациями, разработанными в ходе исследований [85].

Фенотип клеток крови мышей определяли методом пятипараметрического фенотипирования с использованием реагентов фирмы Becton Dickinson (США): CD45-PE-Cy5, CD3-FITC, CD4-Alexa-700, CD8-APC-Cy7, CD19-PE-Cy7. Анализ окрашенных образцов проводили на проточном цитофлуориметре BD FACS Canto™ II (Becton Dickinson, США) в программе BD Diva версии 6.0. В каждой пробе анализировали 10 000 событий CD45<sup>+</sup>-клеток, которые выделяли на графике SSC/CD45. Оценивали абсолютное содержание лейкоцитов ( $10^9$ /л) и относительное содержание (%) основных популяций: гранулоцитов, лимфоцитов и моноцитов. В лимфоцитарном гейте определяли общее содержание Т-лимфоцитов (CD3<sup>+</sup>), Т-хелперов (CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>) и цитотоксических Т-лимфоцитов (CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>), В-лимфоцитов (CD3<sup>-</sup>CD19<sup>+</sup>).

Данные представлены в виде среднего арифметического (Mean) ± среднее квадратичное отклонение (SD). Различия считали достоверными при уровне значимости  $P < 0,05$ .

При анализе иммунограммы установлено, что изменение состава клеток крови экспериментальных животных зависит от плазмидного состава штамма, его вирулентности и сроков наблюдения. Так, у экспериментальных животных, получивших слабо- и авирулентные штаммы *Y. pestis* с разным плазмидным составом, показатели абсолютного содержания лейкоцитов повышались преимущественно на 7 сутки наблюдения, что указывает на пик развития инфекционного процесса

(Рисунок 14). Наибольший эффект на данный показатель оказывал атипичный штамм *Y. pestis* subsp. *altaica* И-2948, что характеризовалось резким увеличением количественных показателей лейкоцитов на 3 сутки в 2 раза по сравнению с контролем и на 11 % по сравнению с физиологической нормой (лейкоциты от  $5,1$  до  $11,6 \cdot 10^9$  кл/л).



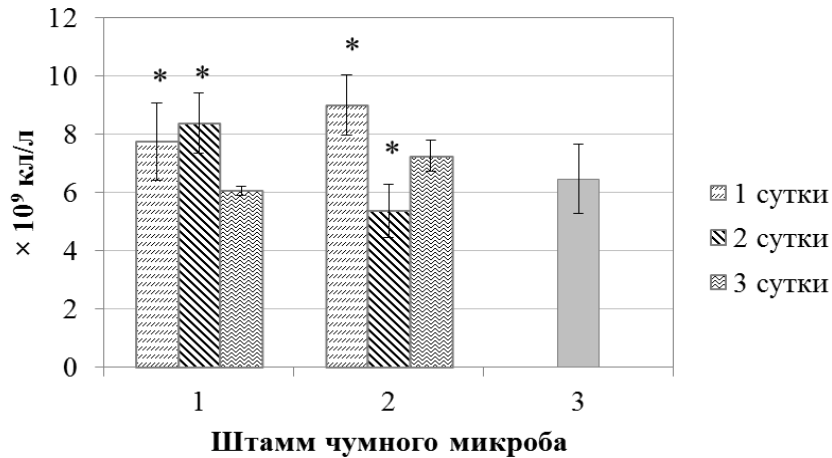
1 – *Y. pestis* subsp. *pestis* И-3479; 2 – *Y. pestis* subsp. *pestis* И-3480; 3 – *Y. pestis* subsp. *altaica* И-2359; 4 – *Y. pestis* subsp. *altaica* И-2948; 5 – *Y. pestis* subsp. *altaica* И-2948/3; 6 – контроль (интактные животные)

Рисунок 14 – Абсолютное содержание лейкоцитов в крови у экспериментальных животных, зараженных слабо- и авирулентными штаммами *Y. pestis* с разным плазмидным составом (Mean  $\pm$  SD); \* –  $P < 0,05$ , \*\* –  $P < 0,01$ , \*\*\* –  $0,001$  по сравнению с контролем

Выявлено повышение количественных показателей моноцитов у всех экспериментальных животных, в то время как изменение процентного содержания гранулоцитов было отмечено только в случае введения мышам штаммов алтайского подвида *Y. pestis* subsp. *altaica* И-2359 и *Y. pestis* subsp. *altaica* И-2948. Кроме того, у белых мышей, получивших культуру штамма *Y. pestis* subsp. *altaica* И-2948, регистрировалась относительная лимфопения при нормально уровне общего

количества лимфоцитов в крови, обусловленная увеличением количества гранулоцитов.

У животных, инфицированных высоковирулентными штаммами основного подвида *Y. pestis* subsp. *pestis* И-2638 и *Y. pestis* subsp. *pestis* И-3560 регистрировался лейкоцитоз (Рисунок 15).



1 – *Y. pestis* subsp. *pestis* И-2638; 2 – *Y. pestis* subsp. *pestis* И-3560; 3 – контроль

Рисунок 15 – Абсолютное содержание лейкоцитов в крови у экспериментальных животных, зараженных высоковирулентными штаммами *Y. pestis* (Mean  $\pm$  SD); \* –  $P < 0,01$  по сравнению с контролем

Обращает внимание резкий переход абсолютного гранулоцитоза в лейкопению у мышей, получивших высоко вирулентный штамм из Горно-Алтайского природного очага *Y. pestis* subsp. *pestis* И-3560, содержащий четыре плазмиды ( $pYR^+pYV^+pTP33^+pYT^+$ ), что является крайне неблагоприятным признаком и свидетельствует о тяжелой форме инфекционного процесса. Лейкопения в сочетании с лимфопенией в случае инфицирования животных культурой *Y. pestis* subsp. *pestis* И-3560 является признаком иммуносупрессии. Следует отметить, что истинная (абсолютная) лимфопения, наблюдающаяся в начальной стадии острых инфекционно-токсических и тяжелых септических процессов, регистрировалась только у мышей, которым введена культура *Y. pestis* с полным набором плазмид (Таблица 6).



Таблица 6 – Показатели содержания популяций лейкоцитов у мышей, получивших культуру *Y. pestis* с разным плазмидным составом (Mean  $\pm$  SD, \* – P < 0,05, \*\* – P < 0,01, \*\*\* – 0,001 по сравнению с контролем)

Штамм	Сутки	Гранулоциты		Лимфоциты		Моноциты	
		10 <sup>9</sup> кл/мл	%	10 <sup>9</sup> кл/мл	%	10 <sup>9</sup> кл/мл	%
Контроль		3,90 $\pm$ 0,96	61,52 $\pm$ 5,07	2,31 $\pm$ 0,49	37,80 $\pm$ 4,33	0,04 $\pm$ 0,01	1,22 $\pm$ 0,49
<i>Y. pestis</i> subsp. <i>pestis</i> И-2638	1	<b>5,84<math>\pm</math>0,95*</b>	<b>70,92<math>\pm</math>9,60**</b>	<b>1,44<math>\pm</math>0,17*</b>	<b>25,77<math>\pm</math>9,62**</b>	<b>0,12<math>\pm</math>0,04***</b>	<b>2,08<math>\pm</math>0,51*</b>
	2	<b>6,12<math>\pm</math>1,02***</b>	<b>76,36<math>\pm</math>7,57***</b>	<b>1,57<math>\pm</math>0,13**</b>	<b>17,66<math>\pm</math>3,73***</b>	<b>0,34<math>\pm</math>0,06***</b>	<b>4,19<math>\pm</math>0,98***</b>
	3	4,25 $\pm$ 0,42	<b>70,72<math>\pm</math>5,22**</b>	<b>1,40<math>\pm</math>0,46**</b>	<b>25,02<math>\pm</math>5,79**</b>	<b>0,10<math>\pm</math>0,02***</b>	<b>1,86<math>\pm</math>0,24*</b>
<i>Y. pestis</i> subsp. <i>pestis</i> И-3560	1	<b>7,28<math>\pm</math>1,38**</b>	<b>76,16<math>\pm</math>2,72**</b>	<b>1,70<math>\pm</math>0,22*</b>	<b>20,35<math>\pm</math>3,41**</b>	<b>0,14<math>\pm</math>0,01***</b>	<b>2,02<math>\pm</math>0,45*</b>
	2	4,48 $\pm$ 0,92	<b>71,75<math>\pm</math>3,66***</b>	<b>0,87<math>\pm</math>0,28*</b>	<b>19,01<math>\pm</math>3,77***</b>	<b>0,31<math>\pm</math>0,05***</b>	<b>6,92<math>\pm</math>1,34***</b>
	3	<b>5,39<math>\pm</math>1,09*</b>	<b>68,42<math>\pm</math>5,76**</b>	2,17 $\pm$ 0,27	<b>28,13<math>\pm</math>4,34**</b>	<b>0,18<math>\pm</math>0,04**</b>	<b>2,69<math>\pm</math>0,54**</b>
<i>Y. pestis</i> subsp. <i>pestis</i> И-3479	3	4,03 $\pm$ 0,93	64,43 $\pm$ 5,87	1,94 $\pm$ 0,66	33,67 $\pm$ 6,28	<b>0,07<math>\pm</math>0,01*</b>	<b>2,23<math>\pm</math>0,51***</b>
	7	<b>5,37<math>\pm</math>1,27*</b>	63,10 $\pm$ 2,94	2,67 $\pm$ 0,02	34,07 $\pm$ 3,92	<b>0,21<math>\pm</math>0,04**</b>	<b>2,21<math>\pm</math>0,49**</b>
	14	2,48 $\pm$ 0,86	58,62 $\pm$ 4,78	1,85 $\pm$ 0,53	37,76 $\pm$ 4,36	0,05 $\pm$ 0,03	<b>0,50<math>\pm</math>0,06**</b>
	21	3,24 $\pm$ 0,79	60,11 $\pm$ 3,05	2,11 $\pm$ 0,66	39,07 $\pm$ 2,93	0,03 $\pm$ 0,01	1,03 $\pm$ 0,15
<i>Y. pestis</i> subsp. <i>pestis</i> И-3480	3	3,26 $\pm$ 0,80	62,72 $\pm$ 4,23	1,90 $\pm$ 0,33	33,62 $\pm$ 6,79	0,03 $\pm$ 0,01	<b>3,24<math>\pm</math>0,83***</b>
	7	3,64 $\pm$ 0,65	59,64 $\pm$ 4,43	2,10 $\pm$ 0,69	35,68 $\pm$ 3,84	<b>0,24<math>\pm</math>0,12**</b>	<b>6,01<math>\pm</math>2,23**</b>
	14	3,10 $\pm$ 0,57	59,66 $\pm$ 4,95	1,65 $\pm$ 0,01	39,45 $\pm$ 4,99	<b>0,09<math>\pm</math>0,01***</b>	1,04 $\pm$ 0,56
	21	3,03 $\pm$ 0,62	61,29 $\pm$ 3,29	1,59 $\pm$ 0,28	34,19 $\pm$ 4,22	0,03 $\pm$ 0,01	1,10 $\pm$ 0,25
<i>Y. pestis</i> subsp. <i>altaica</i> И-2359	3	3,55 $\pm$ 1,06	<b>77,06<math>\pm</math>4,15***</b>	1,58 $\pm$ 0,62	<b>19,14<math>\pm</math>4,93***</b>	<b>0,15<math>\pm</math>0,05*</b>	<b>4,16<math>\pm</math>1,12**</b>
	7	<b>7,44<math>\pm</math>1,50***</b>	<b>78,66<math>\pm</math>7,24***</b>	<b>3,68<math>\pm</math>0,43**</b>	32,09 $\pm$ 9,10	<b>0,39<math>\pm</math>0,08*</b>	<b>4,64<math>\pm</math>2,04*</b>
	14	3,64 $\pm$ 1,05	61,66 $\pm$ 5,73	2,62 $\pm$ 0,90	37,7 $\pm$ 5,86	0,04 $\pm$ 0,01	0,66 $\pm$ 0,16
	21	3,19 $\pm$ 1,18	61,89 $\pm$ 4,23	2,50 $\pm$ 0,07	37,46 $\pm$ 4,14	0,03 $\pm$ 0,01	0,82 $\pm$ 0,17
<i>Y. pestis</i> subsp. <i>altaica</i> И-2948	3	<b>10,04<math>\pm</math>2,47***</b>	<b>77,75<math>\pm</math>6,24***</b>	2,91 $\pm$ 0,39	<b>19,60<math>\pm</math>3,24***</b>	<b>0,53<math>\pm</math>0,13**</b>	<b>5,47<math>\pm</math>2,12**</b>
	7	<b>5,10<math>\pm</math>1,60*</b>	<b>68,89<math>\pm</math>5,80*</b>	2,42 $\pm$ 0,81	<b>27,53<math>\pm</math>6,27***</b>	<b>0,32<math>\pm</math>0,02***</b>	<b>5,43<math>\pm</math>0,77*</b>
	14	3,72 $\pm$ 0,57	<b>72,07<math>\pm</math>3,04**</b>	1,73 $\pm$ 0,34	<b>26,83<math>\pm</math>2,66***</b>	0,04 $\pm$ 0,02	0,90 $\pm$ 0,27
	21	4,06 $\pm$ 0,60	60,53 $\pm$ 1,59	2,35 $\pm$ 0,68	38,40 $\pm$ 1,85	0,03 $\pm$ 0,01	1,24 $\pm$ 0,17
<i>Y. pestis</i> subsp. <i>altaica</i> И-2948/3	3	3,54 $\pm$ 0,83	63,78 $\pm$ 5,21	2,10 $\pm$ 0,68	33,71 $\pm$ 6,27	<b>0,12<math>\pm</math>***</b>	<b>2,31<math>\pm</math>0,86***</b>
	7	4,06 $\pm$ 1,63	67,93 $\pm$ 4,68	1,66 $\pm$ 0,90	32,15 $\pm$ 3,73	<b>0,11<math>\pm</math>0,02***</b>	<b>5,15<math>\pm</math>0,83***</b>
	14	4,09 $\pm$ 0,95	63,05 $\pm$ 2,46	1,95 $\pm$ 0,53	35,93 $\pm$ 2,28	0,02 $\pm$ 0,01	1,12 $\pm$ 0,41
	21	2,53 $\pm$ 0,28	64,08 $\pm$ 4,01	1,57 $\pm$ 0,44	34,30 $\pm$ 4,82	0,04 $\pm$ 0,01	1,06 $\pm$ 0,35

Известно, что содержание Т-лимфоцитов является наиболее информативным показателем при оценке воспалительной реакции организма. Так, у мышей,

зараженных *Y. pestis* subsp. *pestis* И-2638 и *Y. pestis* subsp. *pestis* И-3560, выявлено снижение общего содержания Т-лимфоцитов на 2-3 сутки и Т-хелперов на 2 сутки наблюдения в среднем в 1,3 и 1,6 раза по сравнению с контролем ( $62,52 \pm 8,49$  % и  $43,07 \pm 6,18$  %) соответственно.

Данное обстоятельство может указывать на слабую активацию клеточного звена иммунитета, поскольку иммунологическая перестройка организма на введение экспериментальным животным культуры этих штаммов не успевает развиваться (Таблица 7).

Таблица 7 – Показатели процентного содержания субпопуляций Т-лимфоцитов у мышей, получивших культуру *Y. pestis* с разным плазмидным составом (Mean  $\pm$  SD)

Штамм	Сутки	Т-лимфоциты (CD3 <sup>+</sup> )	Т-хелперы (CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> )	Цитотоксические Т-лимфоциты (CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> )
Контроль		62,52 $\pm$ 8,49	43,07 $\pm$ 6,18	12,13 $\pm$ 1,11
<i>Y. pestis</i> subsp. <i>pestis</i> И-2638	1	66,23 $\pm$ 4,88	38,39 $\pm$ 8,13	11,07 $\pm$ 2,32
	2	<b>38,40<math>\pm</math>4,71**</b>	<b>25,26<math>\pm</math>1,10**</b>	<b>7,71<math>\pm</math>1,28**</b>
	3	<b>47,47<math>\pm</math>3,65**</b>	37,89 $\pm$ 1,12	<b>8,82<math>\pm</math>1,33*</b>
<i>Y. pestis</i> subsp. <i>pestis</i> И-3560	1	62,51 $\pm$ 2,27	39,50 $\pm$ 0,82	<b>10,39<math>\pm</math>0,81*</b>
	2	<b>50,85<math>\pm</math>5,03**</b>	<b>30,88<math>\pm</math>6,02**</b>	10,94 $\pm$ 0,70
	3	<b>50,11<math>\pm</math>2,42**</b>	37,73 $\pm$ 5,64	11,07 $\pm$ 1,72
<i>Y. pestis</i> subsp. <i>pestis</i> И-3479	3	<b>48,58<math>\pm</math>5,07**</b>	<b>34,13<math>\pm</math>7,81*</b>	13,36 $\pm$ 1,55
	7	60,83 $\pm$ 2,35	45,36 $\pm$ 4,29	15,05 $\pm$ 1,54
	14	60,80 $\pm$ 6,96	42,35 $\pm$ 8,96	14,69 $\pm$ 1,87
	21	60,77 $\pm$ 11,07	47,42 $\pm$ 9,66	14,25 $\pm$ 2,52
<i>Y. pestis</i> subsp. <i>pestis</i> И-3480	3	67,39 $\pm$ 3,60	47,84 $\pm$ 5,64	13,91 $\pm$ 2,80
	7	<b>71,43<math>\pm</math>8,42*</b>	46,58 $\pm$ 4,34	14,81 $\pm$ 1,83
	14	59,73 $\pm$ 4,15	40,54 $\pm$ 2,78	14,35 $\pm$ 2,54
	21	64,89 $\pm$ 2,07	53,09 $\pm$ 3,24	10,56 $\pm$ 2,93
<i>Y. pestis</i> subsp. <i>altaica</i> И-2359	3	59,85 $\pm$ 3,03	46,31 $\pm$ 4,86	11,08 $\pm$ 2,14
	7	71,38 $\pm$ 10,90	42,89 $\pm$ 2,72	<b>16,43<math>\pm</math>3,35*</b>
	14	61,17 $\pm$ 2,95	38,41 $\pm$ 5,38	12,02 $\pm$ 3,02
	21	64,33 $\pm$ 4,25	41,06 $\pm$ 2,87	12,91 $\pm$ 1,37
<i>Y. pestis</i> subsp. <i>altaica</i> И-2948	3	66,50 $\pm$ 1,34	46,18 $\pm$ 7,14	12,85 $\pm$ 3,21
	7	67,70 $\pm$ 15,70	<b>34,54<math>\pm</math>1,55**</b>	12,62 $\pm$ 0,77
	14	56,81 $\pm$ 3,71	39,23 $\pm$ 3,80	11,49 $\pm$ 2,38
	21	57,57 $\pm$ 11,29	41,82 $\pm$ 4,15	12,82 $\pm$ 0,10
<i>Y. pestis</i> subsp. <i>altaica</i> И-2948/3	3	60,67 $\pm$ 4,47	45,62 $\pm$ 3,09	13,79 $\pm$ 3,00
	7	70,19 $\pm$ 9,70	41,84 $\pm$ 5,86	13,19 $\pm$ 0,44
	14	61,32 $\pm$ 6,56	42,50 $\pm$ 2,81	12,73 $\pm$ 2,89
	21	67,00 $\pm$ 4,25	45,89 $\pm$ 0,88	13,87 $\pm$ 2,93

Примечание: \* –  $P < 0,05$ , \*\* –  $P < 0,01$  по сравнению с контролем

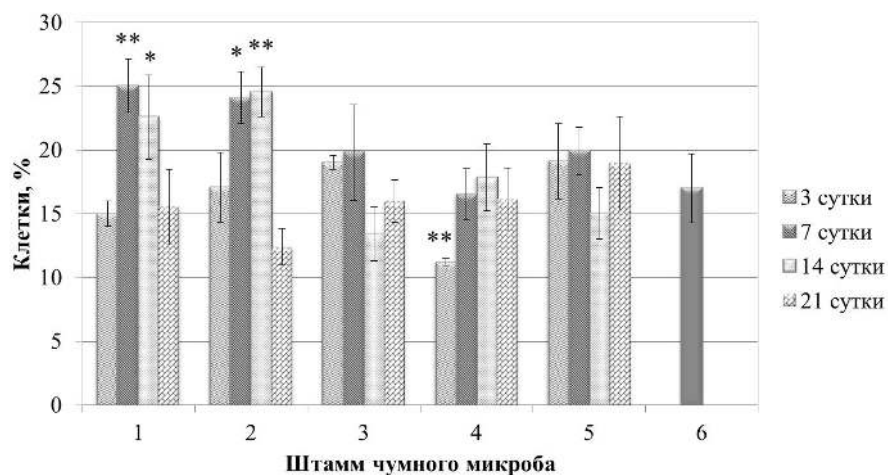
Подтверждением этому также свидетельствует снижение количественных значений CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>-клеток в среднем в 1,4 раза по сравнению с контрольной группой животных (12,13 ± 1,11 %).

После введения белым мышам *Y. pestis* subsp. *pestis* И-3560 (2 сутки) и *Y. pestis* subsp. *altaica* И-2948 (7 сутки) достоверное снижение содержания Т-хелперов сопровождалось уменьшением соотношения CD4/CD8 в 1,3 раза по сравнению с контролем. Следует отметить, что снижение уровня Т-лимфоцитов в опытной группе животных, зараженных *Y. pestis* subsp. *pestis* И-3479 выявлено только на 3 сутки (48,58 ± 5,07 %, P < 0,01) по сравнению с контролем.

При оценке субпопуляционного состава лимфоцитов крови у мышей, зараженных всеми исследованными штаммами, только в случае введения животным культур селекционных штаммов *Y. pestis* subsp. *pestis* И-3479 (pYV<sup>-</sup>) и *Y. pestis* subsp. *pestis* И-3480 (pYР<sup>-</sup>pYV<sup>-</sup>) на 7 и 14 сутки установлено увеличение процентного содержания CD3<sup>-</sup>CD19<sup>+</sup>-клеток (Рисунок 16).

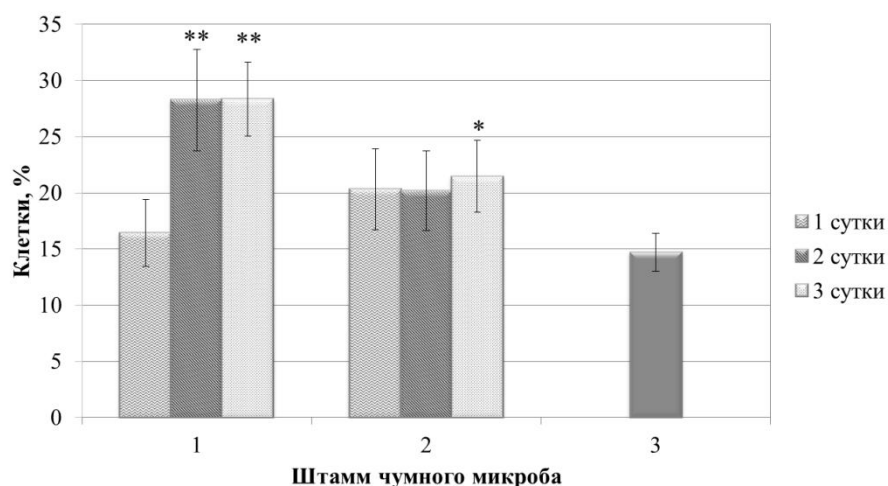
В случае применения в качестве инфекционного агента штаммов основного подвида *Y. pestis* subsp. *pestis* И-2638 и *Y. pestis* subsp. *pestis* И-3560, содержащих полный набор плазмид, повышение этого показателя выявлено на 2-3 сутки (Рисунок 17).

Анализ взаимосвязей клеточного состава крови и плазмидного профиля чумного микроба показал, что на ранних сроках инфекционного процесса повышение содержания гранулоцитов (r = -0,66, P = 0,027), а также снижение – лимфоцитов (r = 0,71, P = 0,014) связано с наличием плазмиды pYV. Отсутствие изменений абсолютного содержания лимфоцитов у мышей, инфицированных изогенными штаммами *Y. pestis* subsp. *pestis* И-3480 (pYР<sup>-</sup>pYV<sup>-</sup>pYT<sup>+</sup>pTP33<sup>+</sup>) и *Y. pestis* subsp. *altaica* И-2948/3 (pYР<sup>-</sup>pYV<sup>-</sup>pYT<sup>+</sup>), а также атипичным – *Y. pestis* subsp. *altaica* И-2948 (pYР<sup>-</sup>pYV<sup>+</sup>pYT<sup>+</sup>), может быть связано с отсутствием плазмиды pYР (r = 0,74, P = 0,009).



1 – *Y. pestis* subsp. *pestis* И-3479; 2 – *Y. pestis* subsp. *pestis* И-3480; 3 – *Y. pestis* subsp. *altaica* И-2359; 4 – *Y. pestis* subsp. *altaica* И-2948; 5 – *Y. pestis* subsp. *altaica* И-2948/3; 6 – контроль

Рисунок 16 – Процентное содержание В-лимфоцитов в крови экспериментальных животных в динамике экспериментальной чумной инфекции, вызванной *Y. pestis* с разным плазмидным составом (Mean  $\pm$  SD); \* –  $P < 0,05$ , \*\* –  $P < 0,01$ , \*\*\* –  $0,001$  по сравнению с контролем



1 – *Y. pestis* subsp. *pestis* И-2638; 2 – *Y. pestis* subsp. *pestis* И-3560; 3 – контроль

Рисунок 17 – Абсолютное содержание В-лимфоцитов в крови экспериментальных животных, получивших культуру высоковирулентных штаммов *Y. pestis* (Mean  $\pm$  SD); \* –  $P < 0,05$ , \*\* –  $P < 0,01$  по сравнению с контролем

При этом, штаммы, лишённые данной плазмиды, не оказывали статистически значимого влияния на снижение популяции Т-лимфоцитов ( $r = 0,68$ ,  $P = 0,021$ ). Показатели же содержания В-лимфоцитов в крови у белых мышей при экспериментальной чумной инфекции не зависят от плазмидного состава штаммов *Y. pestis*.

Таким образом, полученные в ходе исследований данные подтверждают результаты изучения действия чумного микроба с разным набором плазмид на клеточный состав перитонеальной жидкости белых мышей. Важно отметить, что инфекционный процесс, вызванный штаммами с полным набором плазмид (*Y. pestis* subsp. *pestis* И-3560, *Y. pestis* subsp. *pestis* И-2638), сопровождается существенными изменениями клеточных популяций, так как возбудитель чумы блокирует ключевые барьерные механизмы системы врожденного иммунитета и препятствует формированию макроорганизмом полноценного адаптивного иммунитета. В случае заражения мышей бактериями штамма *Y. pestis* subsp. *pestis* И-3560, неблагоприятным прогностическим признаком может рассматриваться сочетание лейко- и лимфопении, что возможно связано с высокой вирулентностью данного штамма ( $LD_{50} = 4$  м. к.). Повышение содержания В-лимфоцитов у экспериментальных животных, которым были введены селекционные штаммы *Y. pestis* subsp. *pestis* И-3479 и *Y. pestis* subsp. *pestis* И-3480, на 7-14 сутки может свидетельствовать об активации процесса пролиферации клеток.

В целом выявлены особенности субпопуляционного состава клеток крови белых мышей, инфицированных штаммами основного и алтайского подвидов и их изогенными вариантами, ассоциированы с плазмидным профилем чумного микроба.

### **3.4 Морфологические изменения в иммунокомпетентных органах белых мышей при экспериментальной чумной инфекции**

Как известно, центральным звеном в патогенезе чумы является способность возбудителя к быстрому распространению и размножению в макроорганизме. Степень развивающихся в нем патологических изменений проявляется в зависимости от вирулентности заражающего штамма возбудителя [5, 6, 51, 76]. Поскольку утрата одной или нескольких плазмид приводит к изменению патогенных свойств и к снижению или даже полной утрате вирулентности возбудителя, а также влияет на морфофункциональное состояние органов иммунной системы, изучение морфологических изменений в иммунокомпетентных органах, позволит количественно охарактеризовать состояние клеточных популяций и оценить соотношение отдельных органных структур.

Цель исследования на данном этапе – выявить особенности патоморфологических изменений в иммунокомпетентных органах экспериментальных животных, инфицированных *Y. pestis* с разным плазмидным составом.

Животные были разделены на восемь групп по 25 особей в каждой. Инфекционный процесс вызывали введением белым мышам подкожно взвеси штаммов чумного микроба в дозе  $10^6$  м.к./0,5 мл забуференного физиологического раствора. Контрольная группа получала подкожно физиологический раствор в том же объеме. Животных усыпляли хлороформом и вскрывали на 1, 3, 7, 10 и 14 сутки с подробным описанием патоморфологических изменений в регионарных лимфатических узлах, селезенке. Материал (селезенка, регионарные лимфатические узлы), забираемый на исследование, фиксировали в 10 % нейтральном формалине, затем обезвоживали по стандартной методике и заливали в целлоидин. Целлоидиновые срезы толщиной 4-5 мкм окрашивали гематоксилин-эозином и метиловым зеленым-пиронином [113]. Количественную оценку пиронинофильных клеток (плазматических) проводили с использованием морфометрии с помощью компьютерной программы «Motic Images Plus» (версия 2). Автоматический анализ изобра-

жения осуществляли с помощью светового микроскопа «Zeiss» (Германия) с видеокамерой «Moticam 2000», разрешение 1392x1040 пикселей, об. 100. Статистическую обработку полученных данных проводили стандартными параметрическими методами с помощью компьютерной программы «Statistica». Для каждой выборки вычисляли среднее арифметическое (Mean) и стандартное отклонение (SD). Статистически значимыми считали различия при уровне значимости  $P < 0,05$ .

Проведен сравнительный анализ анатомических и морфофункциональных изменений иммунокомпетентных органов экспериментальных животных зараженных *Y. pestis* с разным плазмидным составом. В ходе исследования при вскрытии было выявлено увеличение, уплотнение и гиперемия регионарных лимфоузлов у агонирующих белых мышей, инфицированных высоковирулентными штаммами основного подвида с полным набором плазмид (*Y. pestis* subsp. *pestis* И-2638 и *Y. pestis* subsp. *pestis* И-3560), на 1-3 сутки наблюдения. Селезенка увеличена в 1,5-2 раза, темного бурого цвета, дряблая, с многочисленными мелкими очагами, расположенными под капсулой.

У животных, зараженных штаммами алтайского подвида *Y. pestis* subsp. *altaica* И-2359 (pYP<sup>+</sup>pYV<sup>+</sup>pYT<sup>+</sup>) и атипичным штаммом *Y. pestis* subsp. *altaica* И-2948 (pYP<sup>-</sup>pYV<sup>+</sup>pYT<sup>+</sup>) выявлено увеличение регионарных лимфатических узлов в среднем в 1,5-2 раза, узлы плотные и гиперемированные. Отмечено увеличение селезенки на 3 сутки, орган имеет зернистый вид, с наличием мелких белых очагов. Данные изменения усиливаются к 14 суткам. У белых мышей, инфицированных штаммом *Y. pestis* subsp. *altaica* И-2359 (pYP<sup>+</sup>pYV<sup>+</sup>pYT<sup>+</sup>), выявленные изменения носили более выраженный характер. Возможно, это связано с наличием у этого штамма pYP<sup>+</sup>.

На 7 сутки у животных, зараженных штаммом *Y. pestis* subsp. *pestis* И-3479 (pYP<sup>+</sup>pTP33<sup>+</sup>pYT<sup>+</sup> pYV<sup>-</sup>) наблюдалось увеличение регионарных лимфатических узлов в среднем в 2,0 раза по сравнению с контролем и незначительное увеличение селезенки ( $P < 0,05$ ). Эти изменения нивелировались к 14 суткам. Патоморфологические изменения у белых мышей, инфицированных штаммом *Y. pestis* subsp.

*pestis* И-3480 (отсутствуют рУР и рУV, но имеется рУТ) и селекционным штаммом алтайского подвида *Y. pestis* subsp. *altaica* И-2948/3, у которого так же отсутствуют эти плазмиды, выявлены не были.

Наблюдаемые в ходе исследования изменения со стороны иммунокомпетентных органов животных, инфицированных возбудителем чумы основного подвида *Y. pestis* subsp. *pestis* И-2638 и *Y. pestis* subsp. *pestis* И-3560 (с полным набором плазмид), указывает на отсутствие сопротивляемости организма белых мышей на внедрение патогена [20, 25, 69]. Инфекционный процесс в этих случаях приводит к гибели животных в ранние сроки наблюдения (3-4 сутки). При микроскопическом исследовании в регионарном лимфатическом узле животных, зараженных штаммами основного подвида *Y. pestis* subsp. *pestis* И-2638 и *Y. pestis* subsp. *pestis* И-3560, имеет место полнокровие сосудов, а лимфатические фолликулы гиперплазированы. Развитие некроза выявлено на 3 сутки.

Морфометрическое исследование селезенки показало уменьшение доли белой пульпы за счет редукции фолликулов и некроза их клеточных элементов на 1 и 3 сутки по сравнению с контролем. Выявлена пролиферация макрофагов и мегакариоцитов, а также показано, что количество плазматических клеток превосходит значения в контроле в 4-5 раз ( $P < 0,05$ ). Инфекционный процесс, вызванный культурами этих штаммов, развивается очень быстро, сопровождаясь высокой интоксикацией, приводит к летальным исходам уже к 5 суткам. Иммунологическая перестройка организма в этом случае не успевает развиваться.

При заражении белых мышей алтайскими штаммами *Y. pestis* subsp. *altaica* И-2359 и атипичным *Y. pestis* subsp. *altaica* И-2948, только на ранние сроки исследования отмечается иммунная перестройка организма. В случае заражения *Y. pestis* subsp. *altaica* И-2359 развитие инфекционного процесса приводит к гибели белых мышей к 10 суткам. Что касается животных зараженных штаммом *Y. pestis* subsp. *altaica* И-2948 (рУР рТР33), можно предположить, что утрата плазмиды рУР вызывает более затяжной характер инфекционного процесса и гибель животных приходится на 14 сутки исследования.



При микроскопическом исследовании лимфатических узлов белых мышей, зараженных алтайскими штаммами *Y. pestis* subsp. *altaica* И-2359 и *Y. pestis* subsp. *altaica* И-2948, выявлено увеличение площади Т-зависимой зоны (паракортикальной зоны) к 7 суткам, что может свидетельствовать об активации антигензависимой пролиферации и дифференцировки Т-лимфоцитов.

Увеличение площади В-зависимой зоны регионарного лимфатического узла белых мышей, зараженных штаммом *Y. pestis* subsp. *altaica* И-2359, выявлено на 3 сутки, а в группе животных, инфицированных штаммом *Y. pestis* subsp. *altaica* И-2948, – на 7 сутки. Результаты оценки количественных показателей содержания плазматических клеток в мозговых тяжах регионарных лимфатических узлах белых мышей, зараженных *Y. pestis* с разным плазмидным составом представлены на рисунке 18.

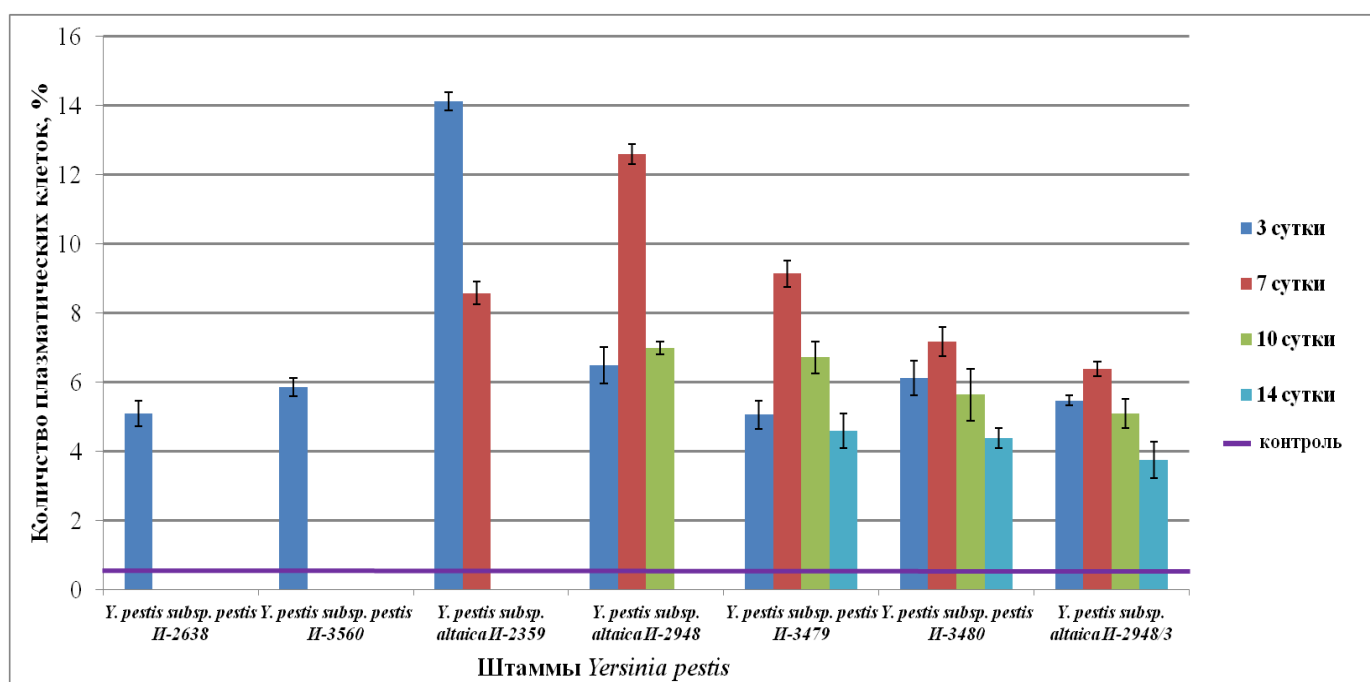


Рисунок 18 – Количество плазматических клеток в мозговых тяжах регионарных лимфатических узлов белых мышей, зараженных *Y. pestis* с разным плазмидным составом

Максимальное количество плазматических клеток выявлено в группе животных, инфицированных штаммом *Y. pestis* subsp. *altaica* И-2359 на 3 сутки в 14 раз ( $P < 0,05$ ), а в случае штамма *Y. pestis* subsp. *altaica* И-2948 на 7 сутки в 13 раз ( $P < 0,05$ ).

При оценке структурных изменений селезенки опытных животных, отмечено, что максимальное преобладание доли белой пульпы по отношению к красной у животных, зараженных штаммом *Y. pestis* subsp. *altaica* И-2359 (pTP33<sup>-</sup>) приходится на 3 сутки, а у животных, инфицированных штаммом *Y. pestis* subsp. *altaica* И-2948 (pY<sup>-</sup>pTP33<sup>-</sup>), – на 7 сутки. В эти сроки отмечена гиперплазия фолликулов за счет увеличения периартериальной зоны и реактивного центра с последующим снижением.

Максимальное содержание плазмоцитов в селезенке у животных, инфицированных штаммом *Y. pestis* subsp. *altaica* И-2359 приходится на 3-7 сутки эксперимента, а у штамма *Y. pestis* subsp. *altaica* И-2948 – только на 7 сутки (Рисунок 19).

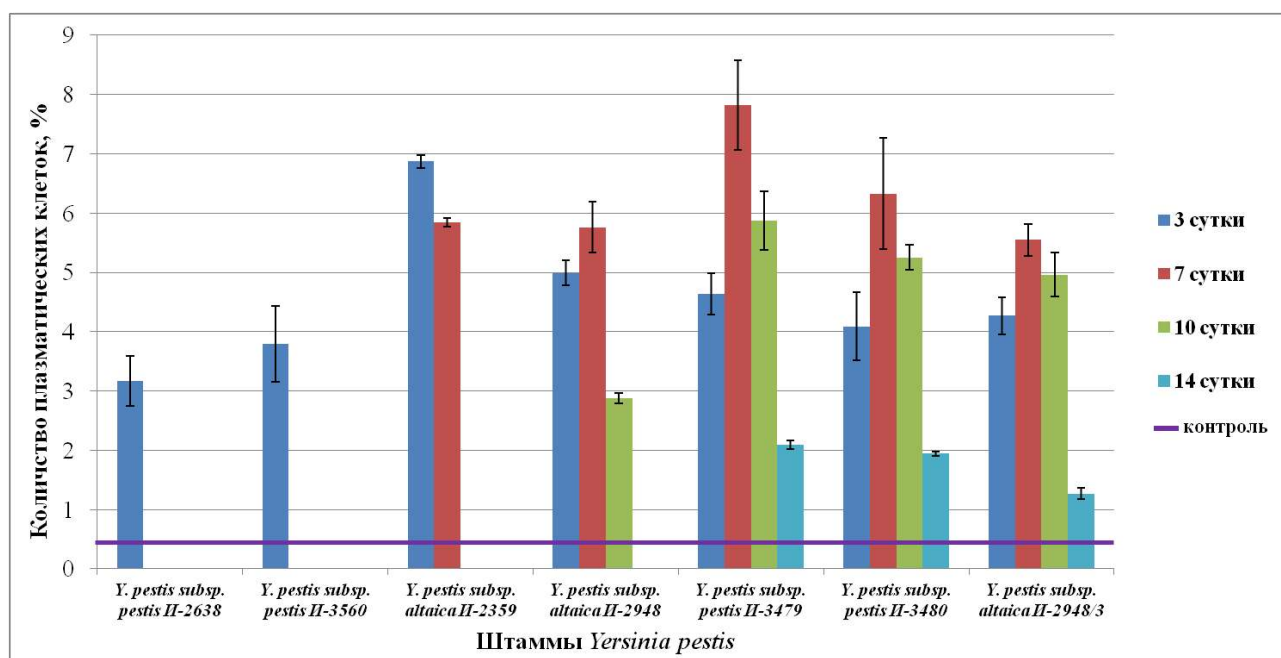


Рисунок 19 – Количество плазматических клеток в селезенке белых мышей, зараженных *Y. pestis* с разным плазмидным составом

При заражении белых мышей селекционным штаммом алтайского подвида *Y. pestis* subsp. *altaica* И-2948/3 и двумя селекционными штаммами основного подвида *Y. pestis* subsp. *pestis* И-3479 и *Y. pestis* subsp. *pestis* И-3480, отмечается существенное увеличение площади Т-зависимой зоны, со слабо выраженной плазмочитарной реакцией. При морфометрическом исследовании лимфатических узлов после заражения изогенным штаммом *Y. pestis* subsp. *pestis* И-3479 (pYV<sup>-</sup>) на 7-10 сутки установлено увеличение объемной доли коркового вещества и паракортикальной зоны.

Максимальные изменения соотношения структурных компонентов лимфатических узлов у белых мышей, инфицированных штаммами с не полным набором плазмид: *Y. pestis* subsp. *pestis* И-3479, *Y. pestis* subsp. *pestis* И-3480 и *Y. pestis* subsp. *altaica* И-2948/3 выявлены на 3 сутки наблюдения по сравнению с контролем (интактные животные). При этом увеличение абсолютного числа плазматических клеток выявлено на 7 сутки.

Установлено увеличение объемной доли белой пульпы селезенки по отношению к красной у опытных животных, инфицированных штаммами *Y. pestis* subsp. *pestis* И-3479, *Y. pestis* subsp. *pestis* И-3480 и *Y. pestis* subsp. *altaica* И-2948/3, на 7 сутки за счет увеличения периартериальной зоны (Т-зависимой зоны) с последующим снижением к 14 суткам. В белой пульпе селезенки опытных животных максимальное количество плазматических клеток отмечается на 7 сутки.

Таким образом, сравнительный анализ показал, что инфекционный процесс, вызванный введением белым мышам штаммов *Y. pestis* subsp. *pestis* И-2638 и *Y. pestis* subsp. *pestis* И-3560 (pYP<sup>+</sup>pYV<sup>+</sup>pYT<sup>+</sup>pTP33<sup>+</sup>) вызывает у животных тяжелый инфекционный процесс в отличие от штаммов с неполным набором плазмид. Важно отметить, что штамм *Y. pestis* И-2359 (pTP33<sup>-</sup>) занимает промежуточное положение между исследованными штаммами и вызывает слабо выраженное развитие инфекционного процесса у экспериментальных животных.

На основании вышеизложенного выявлены морфологические изменения в иммунокомпетентных органах (лимфатические узлы, селезенка) при экспериментальной чумной инфекции, которые проявляются разной степенью выраженности

патологического процесса и активации иммунного ответа, зависящих от плазмидного состава *Y. pestis*.

Увеличение площади Т-зависимых зон в иммунокомпетентных органах белых мышей, инфицированных селекционными штаммами *Y. pestis* subsp. *altaica* И-2948/3, *Y. pestis* subsp. *pestis* И-3479 и *Y. pestis* subsp. *pestis* И-3480, свидетельствует об активации клеточного звена иммунитета, что подтверждается снижением плазмоцитарной реакции.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Чума является особо опасным природно-очаговым инфекционным заболеванием. Учитывая наличие в мире активных природных очагов, регистрацию единичных случаев и вспышек, сопровождающихся высокой летальностью, чума продолжает оставаться серьезной проблемой здравоохранения [3, 28, 35, 43, 118, 145, 200, 207].

В настоящее время полидетерминированность вирулентности патогенных микроорганизмов и, в частности, возбудителя чумы – является общепризнанной. При этом каждая из биомолекул (факторов патогенности) может обладать несколькими активностями, направленными на преодоление различных звеньев системы защиты макроорганизма [6, 94, 160, 230]. Реализация патогенных свойств *Y. pestis* в организме восприимчивого хозяина требует присутствия у возбудителя чумы целого набора факторов патогенности различной функциональной направленности и систем регуляции, обеспечивающих их координированную экспрессию (антигены FI, V, рН6, а также ЛПС, протеаза, мышинный токсин, гиалуронидаза, фибринолизин и др.) [7, 37, 45, 52, 70, 82]. Абсолютизирование роли любого отдельно взятого из указанных факторов некорректно [5, 6, 94, 160, 210, 230]. Однако детальный анализ каждого из этих факторов лежит в основе системного подхода при изучении патогенности *Y. pestis* и разработке эффективных методов профилактики и лечения чумы.

Исследования, посвященные изучению факторов и механизмов патогенности чумного микроба, представляют интерес для ученых во всем мире. На фоне быстрого развития методологии молекулярной биологии, разработки новых методов клеточной биологии и иммунологии, в том числе способов изучения структурно-функциональной организации отдельных биомолекул, появляется возможность по-новому оценить бактериальные факторы патогенности [133, 141, 151, 167, 169, 194 и др.]. Понимание молекулярной и клеточной основы взаимодейст-

вий патоген-хозяин необходимо для разработки современных диагностических, профилактических и лечебных препаратов.

При создании новых иммунизирующих препаратов против чумы необходимо учитывать особенности развития чумной инфекции, в первую очередь, исключительную способность возбудителя уклоняться или подавлять реакцию врожденного иммунитета организма [75, 111, 118, 132, 146]. Известно, что PAMPs возбудителя распознаются специфическими рецепторами врожденного иммунитета – образ распознающими рецепторами (pattern recognition receptors – PRRs) [50, 75, 177, 178]. В связи с этим, исследование возбудителя чумы – *Y. pestis*, в том числе пато- и иммуногенеза инфекции, остается актуальным направлением.

Согласно литературным данным, подавляющее большинство факторов вирулентности *Y. pestis* детерминировано плазмидными генами [5, 6, 40, 50, 141]. В геноме возбудителя чумы алтайского подвида *Y. pestis* subsp. *altaica* имеется три плазмиды: pYV, pYP и pYT. В частности, с наличием плазмиды pYV штаммы иерсиний проявляют фенотипические признаки, действие которых направлено на подавление фагоцитарной активности клеток иммунной системы. Видоспецифическая плазида pYP детерминирует синтез бактериоцина (пестицин 1) и активатора плазминогена, а плазида pYT – мышинового токсина и F1 капсульного антигена F1 [5, 6, 21, 70, 98, 141]. Для возбудителя, который циркулирует в Тувинском очаге, характерно наличие в геноме дополнительной плазмиды pTP33, которая представлена геномом фага, включающего гены двухкомпонентной системы белков токсин-антитоксин YoeB/YefM. По-видимому, белки, кодируемые этой плазмидой, являются факторами адаптации штаммов *Y. pestis* к условиям конкретных ландшафтно-географических биоценозов природных очагов чумы [125].

Утрата одной или нескольких плазмид приводит к изменению патогенных свойств и к снижению или даже полной утрате вирулентности возбудителя, что влияет на морфофункциональное состояния органов иммунной системы [5, 6, 21]. Предположительно плазида pTP33 также играет роль в патогенности этих штаммов [125].

Все это и определило необходимость всестороннего изучения действия штаммов чумного микроба с разным плазмидным составом на иммунокомпетентные клетки экспериментальных животных с применением современных методов, а задача получения сопоставимых данных обусловила проведение экспериментов по единому научно-методическому плану.

Для комплексного сравнительного исследования механизмов реализации патогенного потенциала *Y. pestis*, обусловленного особенностями плазмидного состава возбудителя чумы, циркулирующего в Тувинском и Горно-Алтайском природных очагах чумы, проведены эксперименты с использованием штаммов *Y. pestis* subsp. *pestis* И-2638 (pYP<sup>+</sup>pYV<sup>+</sup>pTP33<sup>+</sup>pYT<sup>+</sup>), его производных с отсутствием плазмид pYP и/или pYV (*Y. pestis* subsp. *pestis* И-3480 (pYP<sup>-</sup>pYV<sup>-</sup>pTP33<sup>+</sup>pYT<sup>+</sup>); *Y. pestis* subsp. *pestis* И-3479 (pYP<sup>+</sup>pYV<sup>-</sup>pTP33<sup>+</sup>pYT<sup>+</sup>)), а также *Y. pestis* subsp. *altaica* И-2948 (pYP<sup>-</sup>pYV<sup>+</sup>pYT<sup>+</sup>) и селекционированным от него *Y. pestis* subsp. *altaica* И-2948/3 (pYP<sup>-</sup>pYV<sup>-</sup>pYT<sup>+</sup>).

С целью выявления особенностей действия чумного микроба с разным плазмидным спектром на макроорганизм лабораторных животных проведено исследование его действия на поглотительную способность и бактерицидный потенциал клеток иммунофагоцитарной системы, пролиферацию клеток крови и их популяционный состав, дегрануляцию тучных клеток, а также морфологические изменения в иммунокомпетентных органах экспериментальных животных.

Главными причинами, лимитирующими реализацию бактерицидного потенциала фагоцитов интактных и иммунизированных морских свинок, является ингибирование чумным микробом процесса конъюгации фагосом с лизосомами, устойчивость к действию лизосомальных ферментов, способность после эндоцитоза покидать фагосому, избегая действия микробицидных факторов, благодаря чему обеспечивается возможность длительное время персистировать в цитоплазме фагоцитов, что и объясняет незавершенный характер фагоцитоза [19, 25, 40, 133, 141, 220, 222, 223, 224]. В связи с этим на первом этапе исследований нами проведено сравнительное изучение цитотоксических и адгезивных свойств штаммов различающихся по плазмидному спектру.

При изучении антифагоцитарных и цитотоксических свойств показано, что штаммы *Y. pestis* обладают супероксиддисмутазной активностью, но ее уровень не зависит от их плазмидного состава. Обнаружены различия в общей перекись разрушающей активности экстрактов клеток *Y. pestis*, содержащих плазмиду pYV и не имеющих таковой.

При изучении адгезивных свойств всех штаммов *Y. pestis*, отобранных для комплексного исследования выявлены различия в способности чумного микроба фиксироваться на поверхности эритроцитов. Установлено, что штаммы *Y. pestis*, утратившие плазмиду вирулентности (pYV<sup>-</sup>) имеющими достоверно низкие показатели адгезивности по сравнению со штаммами *Y. pestis* имеющие данную плазмиду (pYV<sup>+</sup>).

Как известно, решающую роль в развитии приобретенного иммунного ответа играет стимуляция механизмов врожденного иммунитета, что послужило основой для поиска алгоритмов в изучении механизмов врожденного иммунитета [41, 54, 64, 83, 89, 146]. Поскольку фагоциты осуществляют антимикробную защиту организма, то течение и исход инфекционного заболевания во многом зависит от их функционального состояния [146, 128]. Определение степени активности фагоцитирующих клеток и их функций, связанных с бактерицидной способностью, имеет прогностическое значение для характеристики гомеостаза, контроля над течением патологического процесса, эффективностью лечения.

В связи с этим, клетки мононуклеарных фагоцитов и ПЯЛ были взяты в качестве модели для изучения действия чумного микроба с разными фенотипическими свойствами в условиях *in vitro* и *in vivo* на бактерицидные механизмы фагоцитоза (кислородзависимые и кислороднезависимые антимикробные системы фагоцитов) восприимчивых к чуме экспериментальных животных – белых мышей и морских свинок.

При изучении поглотительной (ФИП) и переваривающей (НСТ-тест) способности фагоцитов в отношении чумного микроба с разным плазмидным спектром установлено, что фагоцитарная активность интенсивнее проявлялась у фагоцитов в отношении утративших pYV штаммов (*Y. pestis* И-2948/3, *Y. pestis* И-3479,



*Y. pestis* И-3480) по сравнению со штаммами *Y. pestis* с наличием  $pYV^+$  (*Y. pestis* И-2948, *Y. pestis* И-2359, *Y. pestis* И-2638, *Y. pestis* И-3560 и *Y. pestis* И-2696).

В ходе экспериментов установлено повышение показателей фагоцитарной и бактерицидной активности системы мононуклеарных фагоцитов (ФИП, НСТ-тест, МПО) в отношении штаммов *Y. pestis* И-2948/3, *Y. pestis* И-3479, *Y. pestis* И-3480 по сравнению с *Y. pestis* И-2638 и *Y. pestis* И-3560, что может быть связано с утратой первой группы штаммов плазмид  $pYV$  и  $pYP$  или одной из них. Увеличение в 5,0–7,0 раз ( $P < 0,05$ ) эффекторного потенциала полиморфноядерных лейкоцитов (ПЯЛ) при контакте с чумным микробом по сравнению с перитонеальными макрофагами свидетельствует о возможной более интенсивной активации раннего индуцибельного ответа этих клеток. Кроме того, штаммы *Y. pestis* с полным набором плазмид, в отличие от их изогенных вариантов, как показано в экспериментах, ингибируют высвобождение неферментных катионных белков из гранул ПЯЛ, что может приводить к снижению их бактерицидного действия. Подобную картину установили Е.В. Сазанова с соавторами при изучении цитотоксического воздействия штаммов *Y. pestis* с различной степенью вирулентности на лейкоциты цельной дефибринированной крови человека [109]

Показана в условиях *in vitro* высокая поглотительная способность фагоцитов морских свинок в отношении штамма с остаточной вирулентностью *Y. pestis*  $pYP^-$  (*Y. pestis* subsp. *altaica* И-2948). Наименьшие значения индекса поглощения выявлены у ПМ, примированных высоко вирулентными штаммами *Y. pestis* с полным набором плазмид (*Y. pestis* subsp. *pestis* И-2638 и *Y. pestis* И-3560). Штамм *Y. pestis* subsp. *altaica* И-2359 ( $pYP^+pYV^+pYT^+$ ) по данному показателю занимает промежуточное положение, что позволяет предположить опосредованное участие  $pTP33$  в ингибировании механизмов фагоцитоза.

Установлены различия в количественном и качественном составе тканевых базофилов перитонеальной жидкости белых мышей, инфицированных *Y. pestis* с разным плазмидным составом. Показано, что штаммы чумного микроба, у которых отсутствует одна из плазмид ( $pYP$  или  $pYV$ ), вызывают менее выраженные

процессы дегрануляции этих клеток, характеризующие формирование неполноценного иммунного ответа макроорганизма [5, 6, 51].

Известно, что ранний маркер активации Т-лимфоцитов (CD25) является высокоаффинным рецептором к ИЛ-2, который в свою очередь усиливает пролиферацию Т-лимфоцитов. Основная функция В-клеток – эффекторное участие в гуморальных иммунных реакциях, дифференциация в результате антигенной стимуляции в плазматические клетки, продуцирующие антитела [93, 102]. В связи с этим, следующим этапом наших исследований стало изучение действия чумного микроба с различным плазмидным спектром на механизмы пролиферации иммунокомпетентных клеток и их популяционный состав. Установлено, что все исследованные штаммы чумного микроба, не зависимо от их плазмидного состава, в условиях *in vitro* способствуют повышению экспрессии CD25 В-клетками крови экспериментальных животных в 2,5 раза по сравнению с контролем (интактные животные). Выявлены различия в активации Т-лимфоцитов крови ( $CD3^+CD25^+$ ), в частности Т-хелперов ( $CD3^+CD4^+CD25^+$ ), под действием *Y. pestis* с разным плазмидным составом.

Анализ взаимосвязи клеточного состава крови и плазмидного профиля чумного микроба показал, что на ранних сроках инфекционного процесса повышение содержания гранулоцитов ( $r = -0,66$ ,  $P = 0,027$ ), а также снижение – числа лимфоцитов ( $r = 0,71$ ,  $P = 0,014$ ) связано с наличием у возбудителя плазмиды pYV. Отсутствие изменений абсолютного содержания количества лимфоцитов у мышей, инфицированных изогенными штаммами *Y. pestis subsp. pestis* И-3480 (pY<sup>+</sup>pYV<sup>-</sup>) и *Y. pestis subsp. altaica* И-2948/3 (pY<sup>+</sup>pYV<sup>-</sup>), а также атипичным – штаммом *Y. pestis subsp. altaica* И-2948 (pY<sup>-</sup>), может быть связано с отсутствием плазмиды pY<sup>+</sup> ( $r = 0,74$ ,  $P = 0,009$ ). Кроме того, штаммы, лишённые данной плазмиды, не оказывают статистически значимого влияния на снижение популяции Т-лимфоцитов ( $r = 0,68$ ,  $P = 0,021$ ). Что касается содержания В-лимфоцитов в крови у животных при экспериментальной чумной инфекции, то у белых мышей показатели содержания этих клеток не зависят от плазмидного состава штаммов чумного микроба.

При этом инфекционный процесс, вызванный штаммами с полным набором плазмид (*Y. pestis* subsp. *pestis* И-3560, *Y. pestis* subsp. *pestis* И-2638), сопровождается существенными изменениями состава клеточных популяций в иммунокомпетентных органах. В случае мышей, зараженных *Y. pestis* subsp. *pestis* И-3560 и *Y. pestis* subsp. *pestis* И-2638, неблагоприятным прогностическим признаком может рассматриваться сочетание лейко- и лимфопении, что возможно связано с высокой вирулентностью данных штаммов ( $LD_{50} = 4-10$  м. к.).

При оценке патоморфологической картины лимфатических узлов и селезенки лабораторных животных, инфицированных *Y. pestis* с разным плазмидным спектром патологические изменения характеризуются разной степенью выраженности. Установлены морфологические изменения в иммунокомпетентных органах (лимфатические узлы, селезенка) при экспериментальной чумной инфекции, связанные с наличием или отсутствием у возбудителя плазмиды pYV, которые проявляются разной степенью активации иммунного ответа и выраженностью патологического процесса.

Увеличение площади Т-зависимых зон в иммунокомпетентных органах белых мышей, инфицированных селекционными штаммами *Y. pestis* с отсутствием плазмид pYV и pYP (*Y. pestis* subsp. *altaica* И-2948/3, *Y. pestis* subsp. *pestis* И-3480) и – pYV (*Y. pestis* subsp. *pestis* И-3479), свидетельствует об активации клеточного звена иммунитета.

Выявленные в ходе исследований особенности субпопуляционного состава клеток крови белых мышей, инфицированных штаммами чумного микроба основного и алтайского подвидов и их изогенных вариантов, в большинстве своем, ассоциированы с плазмидным профилем *Y. pestis*.

В процессе проведенного исследования получены новые данные о механизмах реализации патогенного потенциала чумного микроба, обусловленного особенностями плазмидного состава штаммов *Y. pestis*. Выявлены отличия в антифагоцитарных и цитотоксических свойствах, общей перекись разрушающей активности чумного микроба, которые при взаимодействии с макроорганизмом проявляются в различной степени активации поглотительной способности, бактери-

цидного потенциала фагоцитов, пролиферации клеток крови и их популяционного состава, а также в дегрануляции тучных клеток.

Результаты сравнительного исследования позволили установить ряд важнейших параметров морфологических изменений в иммунокомпетентных органах, касающихся активации иммунного ответа и выраженности патологического процесса, экспериментальных животных инфицированных штаммами *Y. pestis* с разным плазмидным спектром.

На основании вышеизложенного и данных литературы нами предложена концептуальная схема закономерностей изменений функционального состояния клеток иммунной системы под действием чумного микроба с разным набором плазмид (Рисунок 20), суть которой заключается в следующем: развитие инфекционного процесса в первые часы после введения *Y. pestis*, а также бактерицидный потенциал фагоцитов и субпопуляционный состав клеток крови ассоциированы с плазмидным профилем чумного микроба.

Активированные моноциты синтезируют ИЛ-1 $\alpha$ , оказывающий аутокринное действие, а также способствующий активации Т-лимфоцитов, синтезирующих В-клеточный ростовой фактор (ИЛ-4). ФНО- $\alpha$  действуя синергично с ИЛ-12, повышает функциональную активность цитотоксических Т-лимфоцитов и их способность к разрушению инфицированных бактериями клеток, что ведет к элиминации возбудителя. В динамике инфекционного процесса, вызванного *Y. pestis* с разным плазмидным спектром, активируется пролиферация иммунокомпетентных клеток и модуляция апоптоза.

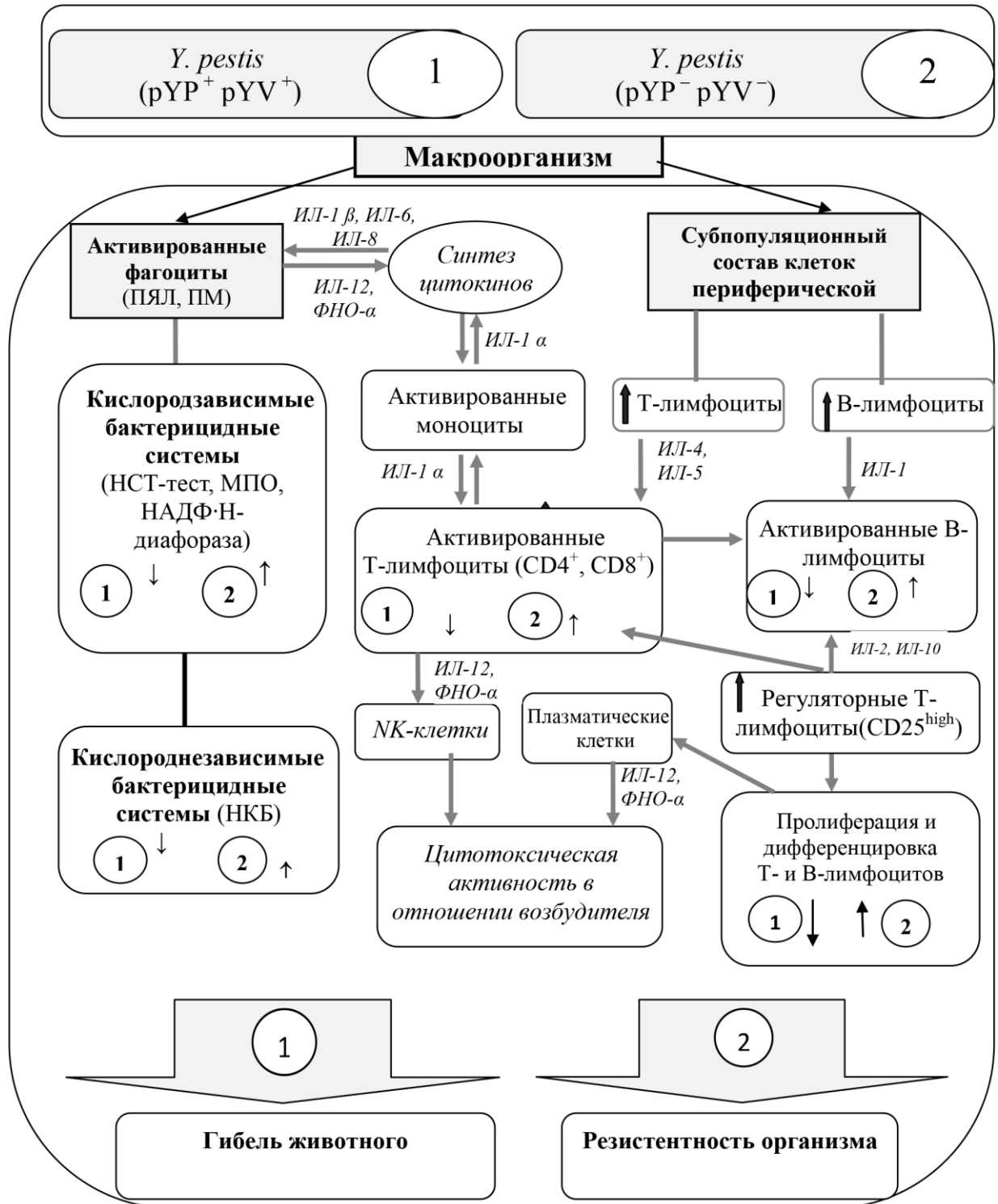


Рисунок 20 – Концептуальная схема, включения бактерицидных механизмов фагоцитоза чумного микроба с разным плазмидным спектром в эксперименте

Примечание: данные литературы выделены курсивом

Утрата одной или нескольких плазмид, в частности, плазмид вирулентности (pYV) и патогенности (pYP) снижает скорость генерализации инфекционного процесса и способность возбудителя вызывать патологические изменения несовместимые с жизнью.

## ВЫВОДЫ

1. Штаммы *Y. pestis*, у которых отсутствует одна из плазмид (pYP или pYV), обладают в 4,3-8,5 раза сниженной адгезивной активностью и в среднем в 2,0 раза меньше ингибируют поглотительную способность фагоцитов лабораторных животных, чем штаммы с полным набором плазмид. Общая перекись разрушающая активность чумного микроба характерна для бактерий штаммов с наличием pYP.

2. Функциональная способность клеток иммунной системы в условиях как *in vitro*, так и *in vivo* в отношении бактерий *Y. pestis*, у которых отсутствует одна из плазмид (pYP, pYV) выражена в большей степени, чем *Y. pestis* с полным набором плазмид, что характеризуется повышением показателей НСТ-теста в среднем на 31,5 %, неферментных катионных белков на 72,7 % и активности миелопероксидазы на 38,5 %.

3. Выявлено снижение общего содержания Т-лимфоцитов и Т-хелперов в (среднем в 1,2 раза) в крови мышей, инфицированных *Y. pestis* с полным набором плазмид по сравнению со штаммами, у которых отсутствуют плазмиды (pYP, pYV). Функциональная активность Т-лимфоцитов и их субпопуляций в крови мышей, инфицированных *Y. pestis* с отсутствием одной из плазмид (pYP, pYV) повышается, достигает максимума к 7-м суткам эксперимента и составляет для Т-лимфоцитов – 71,4 %, цитотоксических Т-лимфоцитов – 16,4 %, а для Т-хелперов к 21 суткам – 53,1 %.

4. Выявлены морфологические изменения в иммунокомпетентных органах (лимфатические узлы, селезенка), которые проявляются разной степенью активации иммунного ответа и выраженностью патологического процесса, зависящих от плазмидного состава *Y. pestis*. Увеличение площади Т-зависимых зон в иммунокомпетентных органах белых мышей, инфицированных *Y. pestis* с не полным набором плазмид (pYP<sup>-</sup>, pYV<sup>-</sup>) свидетельствует об активации клеточного звена иммунитета.

**ПЕРЕЧЕНЬ СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ**

АФК	–	активные формы кислорода
Г6ФДГ	–	глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа
ДМСО	–	диметилсульфоксид
ДСН	–	додецилсульфат натрия
ЗФР	–	забуференный 0,9 % раствор хлорида натрия рН 7,2
ИАМ	–	индекс адгезивности микроорганизма
ИД	–	иммунизирующая доза
ИДТК	–	индекс дегрануляции тучных клеток
ИКК	–	иммунокомпетентные клетки
ИЛ	–	интерлейкин
ИС	–	индекс стимуляции
Ис	–	индекс содержания
ЕОП	–	единица оптической плотности
КА	–	коэффициент адгезии
кДа	–	килодальтон
КЗМ	–	кислородзависимый метаболизм
КОЕ	–	колонии образующие единицы
М	–	молярность раствора
м. к.	–	микробные клетки
м. м.	–	молекулярная масса
мДа	–	мегадальтон
мкг	–	микрограмм
мкМ	–	микромоль
мм	–	миллимоль
МПО	–	миелопероксидаза
МФ	–	макрофаг



НАДН	–	никотинамид аденин динуклеотид восстановленный
НАДФ	–	никотинамид аденин динуклеотид фосфат
НАДФ·Н	–	никотинамидадениндинуклеотид фосфат восстановленный
НКБ	–	неферментные катионные белки
нм	–	нанометры
НСТ	–	нитросиний тетразолий
ОПРА		общая перекись разрушающая активность
ОСО	–	отраслевой стандартный образец
ПААГ	–	полиакриламидный гель
ПК	–	плазматические клетки
ПМ	–	перитонеальные макрофаги
ПЯЛ	–	полиморфноядерные лейкоциты
СОД	–	супероксиддисмутаза
СПА	–	средний показатель адгезии
Трис	–	трис(гидроксиметил) аминометан
ТК	–	тучные клетки
ФИП	–	фагоцитарный индекс поглощения
ЭДТА	–	этилендиаминтетрауксусная кислота
LD <sub>50</sub>	–	доза испытуемого агента, вызывающая гибель 50 % взятых в опыт животных
7-ААД	–	7-амино-актиномизин
АспА	–	кислая фосфатаза
Alexa-700	–	флуорохромный краситель
AnV	–	аннексин V
АРС	–	аллофикоцианин
ASC	–	ассоциированный с апоптозом протеин
CD	–	кластер дифференциации
FITC	–	флуоресцеинизотиоцианат

Ig	–	иммуноглобулин
NF-κB	–	транскрипционного ядерного фактора
subsp.	–	подвид (subspecies)
pH 6	–	антиген (пили адгезии)
PAMPs	–	патоген-ассоциированные молекулярные структуры
PE	–	фикоэритрин
PKA, PKC	–	протеин киназы
pTP33	–	дополнительная плаزمида в геноме чумного микроба
PRRs	–	образ распознающие рецепторы
PsaA	–	белок PsaA – pH six antigen
pYP	–	плазмида пистициногенности (pPst)
pYT	–	плазмида токсигенности (pFra)
pYV	–	плазмида кальцийзависимости (pCad)
TLR	–	Toll-подобный рецептор

**СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ**

1. Апарин, Г.П. Микробиология чумы (руководство) / Г.П. Апарин, Е.П. Голубинский // Иркутск: Изд-во Иркут. ун-та. – 1989. – 92 с.
2. Активность глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы чумного микроба *Yersinia pestis* с разным плазмидным профилем и взаимодействующих с ним перитонеальных макрофагов морских свинок / Ж.А. Коновалова, Г.Б. Мухтургин, В.И. Дубровина и др. // Известия иркутского государственного университета. Серия: биология. Экология. – 2011. – Том 4, № 4 – С. 53–57.
3. Актуальные вопросы совершенствования специфической профилактики чумы и сибирской язвы / С.А. Витязева, С.В. Балахонов, В.И. Дубровина и др. // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. – 2011. – № 4. – С. 63–66.
4. Анализ нуклеотидной последовательности криптической плазмиды рTP33 *Yersinia pestis* из Тувинского природного очага чумы / М.В. Афанасьев, С.В. Балахонов, Е.Г. Токмакова и др. // Генетика. – 2016. – Т. 52. – № 9. – С. 1012–1020.
5. Анисимов, А.П. Факторы, обеспечивающие циркуляцию и сохранение возбудителя чумы в экосистемах природных очагов. Сообщение 1 // Молекулярная генетика, микробиол. и вирусол. – 2002. – № 3. – С. 3–23.
6. Анисимов, А.П. Факторы, обеспечивающие циркуляцию и сохранение возбудителя чумы в экосистемах природных очагов. Сообщение 2 // Молекулярная генетика, микробиол. и вирусол. – 2002. – № 4. – С. 3–11.
7. Анисимов, А.П. Молекулярно-генетические механизмы образования и функциональная значимость капсулы *Yersinia pestis*: автореф. дис. ... доктора мед. наук: 03.00.07. – Саратов, Оболенск. 2000. – 39 с.
8. Аспартаза и фосфоглюкомутаза – маркеры вирулентности *Y. pestis* (Обзор литературы) / Ж.А. Коновалова, С.В. Балахонов, В.И. Дубровина и др. // Бюллетень ВСНЦ СО РАМН – 2011. – № 3 (79), Часть 1. – С. 247–250.
9. Атлас возбудителей особо опасных бактериальных инфекционных болезней / Под ред. акад. РАН В.В. Кутырева. – Саратов: Амирит, 2015. – 168 с.

10. Базанова, Л.П. Первый случай выделения *Yersinia pestis* subsp. *pestis* в алтайском горном природном очаге чумы. Сообщение 2. Вероятные пути и механизмы заноса возбудителя возбудителя чумы основного подвида на территорию очага / Л.П. Базанова, Е.Г. Токмакова, Г.А. Воронова, С.В. Балахонов, Т.И. Иннокентьева // Проблемы особо опасных инфекций. – 2013. – № 2. – С. 5-10.

11. Базанова, Л.П. Влияние плазмидного состава *Yersinia pestis* на образование биопленки в организме блох с разной векторной активностью / Л.П. Базанова, Е.Г. Токмакова, Г.А. Воронова, С.В. Балахонов // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2018. – № 2 – С. 76–83.

12. Балахонов, С.В. Геномные маркеры возбудителей чумы, псевдотуберкулеза, холеры, бруцеллеза: автореф. дис. ... докт. мед. наук 03.00.07, Саратов, 2000. – 33 с.

13. Балахонов, С.В. Получение коллекции изогенных мутантов референтного штамма *Y. pestis* И 2638 с разным плазмидным составом / С.В. Балахонов, Е.Г. Токмакова, Р.И. Пещерова // Противочумные учреждения и их роль в обеспечении эпидемического благополучия населения страны: Материалы конф., посвященной 70-летию Противочумного центра. – Москва, 2004. – С. 94–97.

14. Балахонов, С.В. Трансграничные природные очаги чумы Российской Федерации и Монголии: новые угрозы и меры по обеспечению эпидемиологического благополучия / С.В. Балахонов, В.М. Корзун, С.А. Косилко, Н. Цогбадрах, Д. Цэрэнноров, Д. Отгонбаяр // Журнал инфекционной патологии. – 2018. – Т. 23. – № 1–4. – С. 10.

15. Балахонов, С.В. Случай заболевания человека чумой в Кош-Агачском районе Республики Алтай в 2015 г. Сообщение 2. Микробиологическая и молекулярно-генетическая характеристика изолированных штаммов / С.В. Балахонов, М.Б. Ярыгина, Е.Н. Рождественский, Г.Х. Базарова, С.А. Витязева, А.С. Остяк, Е.П. Михайлов, А.И. Мищенко, А.В. Денисов, С.А. Косилко, В.М. Корзун // Проблемы особо опасных инфекций. – 2016. – № 4. – С. 51–55.

16. Брюханова, Г. Д. Актуальные аспекты эпидемиологии и микробиологии чумы в современных условиях. Дис. ... докт. мед. наук. Саратов; 2004.

17. Бахтеева И.В. Исследование функциональной активности рН 6 антигена *Yersinia pestis* с помощью наборов изогенных мутантов: автореф. дис. ... канд. мед. наук: 03.00.07. – Москва. – 2008. – 24 с.

18. Биологические свойства триптофанзависимых штаммов чумного микроба, изолированных в Горном Алтае / А.И. Логачев, С.В. Балахонов, С.А. Белькова и др. // Acta Biomedica Scientifica. – 2004. – Т. 2. – № 1. – С. 107.

19. Бугоркова, С.А. Научно-методические основы оценки влияния возбудителей холеры, чумы и туляремии на адаптационно-компенсаторные реакции биомоделей // автореф. дис. ... докт. мед. наук. Саратов, 2008. – 43 с.

20. Бугоркова, С.А. Морфофункциональная характеристика иммунокомпетентных органов мышей линии BALB/c при иммунизации вакцинным штаммом *Yersinia pestis* EV НИИЭГ на фоне иммуномодуляции / С.А. Бугоркова, А.Ф. Кuryлина, Т.Н. Щуковская // Проблемы особо опасных инфекций. – 2017. – № 2. – С. 58–63.

21. Бывалов, А.А. Современное состояние проблемы совершенствования средств вакцинопрофилактики чумы / А.А. Бывалов, В.В. Кутырев // Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. – 2011. – № 2. – С. 97–104.

22. Вариабельность возбудителя чумы и проблемы его диагностики / С.А. Лебедева, А.Л. Трухачев, В.С. Иванова, и др. // Под ред. С.А. Лебедева. – Ростов-на-Дону.: «Антей», 2009. – 533 с.

23. Васильева, Г.И. Влияние комплекса монокинов, индуцированных *Yersinia pestis* EV, на функциональную активность нейтрофилов при формировании противочумного иммунитета. / Г.И. Васильева, А.К. Киселева, И.А. Иванова // Цитология. – 2002. С. 799–802.

24. Вержуцкий, Д.Б. О некоторых дискуссионных проблемах природной очаговости чумы / Д.Б. Вержуцкий, С.В. Балахонов // Медицинская паразитология и паразитарные болезни. – 2016. – № 1. – С. 5–12.

25. Витязева, С.А. Закономерности формирования иммунного ответа макроорганизма на введение *Yersinia pestis* EV в сочетании с иммуномодуляторами

(экспериментальное исследование): автореф. дис. ... канд. мед. наук. – Иркутск, 2009. – 22 с.

26. Витязева, С.А. Тканевые базофилы, как представители многочисленной клеточной популяции АПУД-системы / С.А. Витязева, Т.П. Старовойтова, А.В. Бушкова // Деп. в ВИНТИ № 376 – В2010 17.06.2010. – 18 с.

27. Галактионов, В.Г. Иммунология / В.Г. Галактионов. – М. : «Академия», 2004. – 523 с.

28. Вспышка легочной чумы на о. Мадагаскар в 2017 г. / А.Ю. Попова, В.В. Кутырев, С.А. Щербакова и др. // Проблемы особо опасных инфекций. – 2017. – № 4. – С. 5–14.

29. Гариб, Ф.Ю. Взаимодействие патогенов с врожденным иммунитетом / Ф.Ю. Гариб. – М. : Изд-во Московского ун-та, 2013 – 48 с.

30. Генотипирование и внутривидовая таксономия чумного микроба / А.П. Анисимов, М.Е. Платонов, В.В. Евсеева и др. // Журнал инфекционной патологии. – 2009. – Т. 16, № 3. – С. 64.

31. Генетические маркеры иммунного ответа на антигены *Yersinia pestis* F1 и V микрокапсулированной чумной вакцины / Е.Л. Назарова, И.А. Дятлов, Н.М. Поздеев и др. // Russian Biomedical Research. – 2017. – Т. 2. – № 1. – С. 908–915.

32. Генетическая диагностика: полиморфизм генов цитокинов / Ф.Ф. Ризванова, О.И. Пикуза, Р.А. Файзуллина и др. // Практическая медицина. – 2010. – № 6 (45). – С. 41–43.

33. Голубинский, Е. П. Активность бактерицидных систем фагоцитов у интактных и иммунизированных против туляремии морских свинок / Е. П. Голубинский, И. С. Бойкова, В. И. Дубровина // Журн. микробиол. – 1995. – № 2. – С. 77–79.

34. Гончаров, А.Ю. Структурно-функциональная организация участка ДНК рУТ плазмиды, ответственного за синтез фракции 1 чумного микроба: автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.00.04. – Ростов-на-Дону. 1996. – 21 с.

35. Горно-Алтайский природный очаг чумы: ретроспективный анализ, эпизоотологический мониторинг, современное состояние / под ред. С.В. Балахонова, В.М. Корзуна. Новосибирск, 2014. – 272 с.

36. Данилов, Р.К. Гистология человека в мультимедиа / Р.К. Данилов, А.А. Клишов, Т. Г. Боровая // Учебник для студентов медицинских вузов. – СПб. : ЭЛБИ-СПб., 2004. – 362 с.

37. Дентовская, С.В. Молекулярно-генетические механизмы образования и функциональная значимость липополисахарида *Yersinia pestis*: автореф. дис. ... доктора биол. наук: 03.02.03 – Москва. 2012. – 42 с.

38. Домарадский, И.В. Чума: современное состояние, гипотезы, проблемы / И.В. Домарадский. – Саратов : Изд-во Саратовского медицинского ин-та, 1993. – 130 с.

39. Домарадский, И.В. Чума / И.В. Домарадский. – М. : Медицина. – 1998.

40. Дубровина, В.И. Механизмы фагоцитоза и его роль при формировании резистентности организма к возбудителям чумы, псевдотуберкулеза и туляремии: автореф. дис. ... доктора биол. наук: 14.00.16 – Иркутск. 2004.– 42 с.

41. Дубровина В.И. Функциональные особенности фагоцитов при инфекционном и вакцинальном процессе, вызываемом *Francisella tularensis*. – Иркутск: 2002. – 119 с.

42. Жаринова, Н.В. Биологические особенности штаммов *Yersinia pestis* и состояние эпизоотической активности Центрально-Кавказского высокогорного природного очага чумы: автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.00.07, 14.00.30. – Ставрополь. – 2004. – 168 с.

43. Заболевание человека чумой в Горно-Алтайском высокогорном природном очаге в 2014 г. Сообщение 1. Эпидемиологические и эпизоотологические особенности проявлений чумы в Горно-Алтайском высокогорном (Сайлюгемском) природном очаге чумы / В.В. Кутырев, А.Ю. Попова, Е.Б. Ежлова и др. // Проблемы особо опасных инфекций. – 2014. – № 4. – С. 9–16.

44. Заболевание человека чумой в Горно-Алтайском высокогорном природном очаге в 2014 г. Сообщение 2. Особенности лабораторной диагностики и мо-

лекулярно-генетическая характеристика выделенных штаммов / В.В. Кутырев, А.Ю. Попова, Е.Б. Ежлова и др. // Проблемы особо опасных инфекций. – 2014. – № 4. – С. 43–51.

45. Избирательная вирулентность неосновных подвидов *Yersinia pestis* не связана со структурным полиморфизмом V антигена / М.Е. Платонов, В.В. Евсеева В.В., Т.Э. Светоч и др. // Журнал инфекционной патологии. – 2009. – Т. 16, № 3. – С. 174–175.

46. Изменение активности миелопероксидазы и кислой фосфатазы в нейтрофилах периферической крови человека при стимуляции клеток *in vitro* / Т.Л. Бурая, А.А. Бутаков, В.А. Дрожеников и др. // Журн. микробиол. – 1991. – № 10. – С. 52–55.

47. Инструкция по контролю специфической стерильности экспериментальных препаратов, приготовленных из культур чумного или холерного микробов – Саратов – 1982.

48. Инфекция и иммунитет: учебное пособие / В.И. Дубровина, В.В. Войткова, О.В. Юрьева и др. – Иркутск: ФГБУ «НЦРВХ» СО РАМН, 2015. – 168 с.

49. Информационный бюллетень ВОЗ. Чума. 31. Октября 2017г. [www.who.int/ru/news-room/fact-sheets/detail/plague](http://www.who.int/ru/news-room/fact-sheets/detail/plague)

50. Исторические и современные представления о проблеме специфической профилактики чумы / С.А. Бугоркова, З.Л. Девдарини, Т.Н. Щуковская, В.В. Кутырев // Пробл. особо опасных инф. – 2013. – № 3. – С. 63–69.

51. Каграманов, В.С. Показатели кислотно-щелочного равновесия крови у экспериментальных животных под влиянием «мышинного» токсина и капсульного антигена *Yersinia pestis* / В.С. Каграманов, Л.Е. Асеева, В.П. Вагнер // Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунол. – 2001. – № 3. – С. 8–11.

52. Капсульный антиген чумного микроба / Л.А. Кадникова, П.Х. Копылов, С.В. Дентовская и др. // Инфекция и иммунитет. – 2015. – Т. 5, № 3. – С. 201–218.

53. Кашкин, К.П. Иммунная реактивность организма и антибиотическая терапия / К.П. Кашкин, З.О. Караев – Л.: Медицина, 1984. – 200 с.



54. Клеточные и гуморальные факторы иммунитета в патогенезе сибирской язвы / Под ред. С.В. Балахонова. ISBN 978-5-98277-227-1. – Иркутск: НЦРВХ, 2018. – 142 с.

55. Книрель, Ю.А. Липополисахарид чумного микроба *Yersinia pestis*: структура, генетика, биологические свойства / Ю.А. Книрель, А.П. Анисимов // Acta naturae. – Т. 4, № 3 (14). – 2012. – С. 49–61.

56. Кольцова, Е.Г. Некоторые свойства пестицина 1 и передача пестициногенного фактора *in vitro*: автореф. дис. ... канд. мед. наук: 03.096. – Ростов-на-Дону. – 1970. – 16 с.

57. Коновалова, Ж.А. Бактерицидные механизмы фагоцитоза *Yersinia pseudotuberculosis* с разным набором плазмид: автореф. дис. ... канд. биол. наук: 14.00.16. – Иркутск. – 2002. – 18 с.

58. Координация мероприятий противочумных учреждений Роспотребнадзора по оздоровлению Горно-Алтайского высокогорного природного очага чумы в 2016 г. / А.Ю. Попова, В.В. Кутырев, С.В. Балахонов и др. // Проблемы особо опасных инфекций. 2016. – № 4. – С. 5–10.

59. Кравцов, А.Л. Формирование внеклеточных ловушек – эффективный механизм защиты организма от патогена // Проблемы особо опасных инфекций. – 2012. – вып. 112, № 2. – С. 69–74.

60. Кравцов, А.Л. Роль нейтрофильных внеклеточных ловушек при особо опасных бактериальных инфекциях // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2016. – № 4. – С. 95–104.

61. Красноженов, Е.П. Влияние инфекционного процесса на морфофункциональную характеристику тканевых базофилов / Е.П. Красноженов, Ю.В. Федоров // Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунол. – 1996. – № 1. – С. 107–108.

62. Кубанов, А.А. Распознающие рецепторы врожденного иммунитета (толл-подобные рецепторы) в патогенезе заболеваний кожи / А.А. Кубанов, Т.В. Абрамова // Цитокины и воспаление. – 2015. – Т. 14, № 1. – С. 11–17.

63. Куклева, Л.М. Сравнительная характеристика биохимических свойств штаммов разных подвигов *Yersinia pestis* и *Yersinia pseudotuberculosis* / Л.М. Кук-

лева, И. А. Кузьмиченко, О. А. Проценко // Пробл. особо опасных инф. – 2001. – Вып. 81. – С. 105–110.

64. Куличенко, А.Н. Использование теста активации базофилов с антраксинном для лабораторной (*in vitro*) диагностики сибирской язвы / А.Н. Куличенко, Е.Л. Ракитина, Д.Г. Пономаренко, О.В. Логвиненко, А.Г. Рязанова // Проблемы особо опасных инфекций. – 2012. – Вып. 3 (113). – С. 86–88.

65. Курбанов, А.И. Антиоксидантные ферменты микроорганизмов как потенциальные факторы патогенности // Международный медицинский журнал. – 2009. – Т. 15. – № 1. – С. 136–139.

66. Кутырев, В.В. Генетический анализ факторов вирулентности возбудителя чумы: автореф. дис. ... доктора мед. наук: 03.00.07. – Саратов 1992. – 38 с.

67. Кутырев, В. В. Актуальные проблемы особо опасных инфекционных болезней и санитарная охрана территорий в современных условиях // Журн. микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. – 2008. – №. 1. – С. 17–23.

68. Кэмбелл, Г. Чума. / Г. Кэмбелл, Д. Деннис // From Harrison's Principles of Internal Medicine 14-th edition. Available at: [http://medbiol.ru/medbiol/infect\\_har/004401d0.htm#00441e5f.html](http://medbiol.ru/medbiol/infect_har/004401d0.htm#00441e5f.html).2002

69. Манских В.Н. Патоморфология печени лабораторной мыши: подводные камни на пути к верному диагнозу / электронный сайт *ruslasa. Ru*

70. Марков, Е. Ю. Структура и иммуноадьювантные свойства CpG–ДНК / Е. Ю. Марков, В.С. Половинкина // Медицинская иммунология. – 2010. – № 12 (6). –С. 469–476.

71. Мека-Меченко, Т.В. Микробиологический и молекулярно-генетический мониторинг возбудителя чумы из природных очагов разного типа: автореф. дис. ... доктора мед. наук: 03.00.07. – Алматы. – 2010. – 46 с.

72. Меркулов, Г.А. Курс патогистологической техники / Г.А. Меркулов. – Л. : Медицина, 1969. – 423 с.

73. Метаболические процессы при воздействии факторов патогенности чумного микроба вакцинного штамма EV / Г.А. Афанасьева, К.А. Бизенков,

М.Н. Бутковская и др. // Успехи современного естествознания – 2004. – № 9 – С. 110–113.

74. Методика изучения адгезивного процесса микроорганизмов / В.И. Брилис, Т.А. Брилене, Х.П. Ленцнер и др. // Лаб. дело. – 1986. – № 4. – С. 210–212.

75. Микшис, Н.И. Современные тенденции в конструировании рекомбинантных вакцин для специфической профилактики чумы / Н.И. Микшис, О.М. Кудрявцева, В.В. Кутырев // Журн. микробиол. – 2015. – № 3. – С. 116–126.

76. Моделирование чумной инфекции при заражении авирулентными штаммами *Yersinia pestis* / Е.В. Сазанова, А.Н. Малахаева, Т.А. Малюкова и др. // Проблемы особо опасных инфекций. – 2017. – № 2. – С. 45–50.

77. Можаров, О.Т. Молекулярно-биологическая характеристика плазмиды пестициногенности чумного микроба: автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.00.07. – Саратов. 1983. – 173 с.

78. Молекулярное типирование *Y. pestis*. Обзор / М.Е. Платонов, В.В. Евсеева, С.В. Дентовская и др. // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. – 2013. – № 2. – С. 3–12.

79. Морфофункциональная характеристика иммунокомпетентных органов мышей линии BALB/c при иммунизации вакцинным штаммом *Yersinia pestis* EV НИИЭГ на фоне иммуномодуляции / С.А. Бугоркова, А.Ф. Курылина, Т.Н. Щуковская // Проблемы особо опасных инфекций. – 2017. – № 2. – С. 58–63.

80. Морфофункциональные основы регенерационной терапии природными лекарственными средствами экспериментальных повреждений печени / И.О. Убашеев, К.С. Лоншакова, А.И. Бартанов и др. // – Улан-Уде : Изд-во БНЦ СО РМ, 2005. – 224 с.

81. Мультилокусное VNTR и DFR типирование изолятов *Yersinia pestis* из природных очагов СНГ и Монголии / С.В. Дентовская, М.Е. Платонов, М.Ю. Шестопапов и др. // Чрезвычайные ситуации международного значения в общественном здравоохранении и санитарная охрана территорий государств участников Содружества Независимых Государств: Матер. VII Межгос. науч.-практ. конференции государств участников СНГ // Под ред. академика РАМН Г.Г. Онищенко,

члена-корр. РАМН В.В. Кутырева, д.м.н. профессора И.А. Дятлова. – Протвино : А-ПРИНТ ЗАО, 2006. – 97 с.

82. Нактинис, В.И. Два простых метода выделения ДНК из различных источников с применением цетавлона / В.И. Нактинис, Н.Е. Малеева, Д.Ф. Санько // Биохимия. – 1977. – № 42 (10). – С. 1783–1789.

83. Научно-методическое обеспечение мероприятий по проведению иммунологического мониторинга вакцинированных против чумы лиц, проживающих на территориях природных очагов инфекции / С.А. Бугоркова, Т.Н. Щуковская, Н.И. Микшис и др. // Проблемы особо опасных инфекций // Проблемы особо опасных инфекций. – 2018, вып. 2. – С. 6–13.

84. Некоторые особенности взаимодействий *Xenopsylla cheopis* и возбудителя чумы с различным плазмидным составом / Е.Г. Токмакова, Г.А. Воронова, Л.П. Базанова и др. // Материалы I Всероссийского совещания по кровососущим насекомым. Тезисы. – 2006. – С. 197–199.

85. Обеззараживание образцов крови, содержащих *Yersinia pestis*, для проведения цитофлуориметрических исследований: Метод. рекомендации / В.В. Войткова, В.И. Дубровина, Т.А. Иванова, Г.Б. Мухтургин, К.М. Корытов, С.В. Балахонов. – Иркутск, 2015. – 14 с.

86. Онищенко, Г.Г. Лабораторная диагностика опасных инфекционных болезней: практическое руководство / Под ред. Г.Г. Онищенко, В.В. Кутырева. – М. : Медицина, 2009. – 470 с.

87. Определение функциональной активности лейкоцитов периферической крови в качестве показателя неспецифической защиты организма / Л.М. Сомова, Н.Г. Плехова, Н.М. Кондрашева и др. – Методические рекомендации. – Владивосток, 2005. – 24 с.

88. Определение функционального состояния фагоцитов в качестве показателя неспецифической защиты организма: Метод. рекомендации / В.И. Дубровина, Ж.А. Коновалова, О.Б. Колесникова и др. – Иркутск, 2008. – 10 с.

89. Определение экспрессии CD69 на лимфоцитах мышей иммунизированных против чумы в ответ на стимуляцию антигенами чумного микроба / В.В. Фир-

стова, И.В. Бахтеева, Г.М. Титарева, Е.Ю. Зырина, С.А. Иванов, А.П. Анисимов // Медицинская иммунология. – 2009. – Т. 11, № 4-5.– С. 336–337.

90. Особенности штаммов возбудителя чумы, не продуцирующих основного капсульного антигена F1, и апробация отдельных методов их детекции / Т.Е. Арсеньева, А.Л. Трухачёв, Е.А. Васильева и др. // *Universum: химия и биология*. – 2014. – № 8 (8). – С. 2–13.

91. Особенности эпизоотической и эпидемической активности Горно-Алтайского природного очага чумы в 2012-2016 годах / В.М. Корзун, С.В. Балахонов, С.А. Косилко и др. // *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. – 2017. – № 1 (92). – С. 36–38.

92. Организация работы и обеззараживание материала, содержащего возбудителя чумы при проведении исследований методом проточной цитофлуориметрии / В.В. Кутырев и др. – Методические рекомендации. – Саратов, 2008. – 22 с.

93. Основные поверхностные маркеры функциональной активности Т-лимфоцитов / Л.С. Литвинова, А.А. Гуцол, Н.А. Сохоневич и др. // *Медицинская иммунология*. – 2014. – Т. 16, № 1. – С. 7–26.

94. Остерман Л.А. Методы исследования белков и нуклеиновых кислот. М.: Наука, 1981.– 288 с.

95. Оценка иммунологической эффективности вакцинации против чумы в активном природном очаге. Сообщение 1. Цитокиновый и иммуноглобулиновый статус / К.М. Корытов, В.В. Войткова, В.И. Дубровина и др. // *Эпидемиология и Вакцинопрофилактика*. – Москва, 2017. – № 2 (93). – С. 45–49.

96. Оценка приобретенного иммунитета против сибирской язвы по степени повреждения лейкоцитов крови *in vitro* антраксином / Т.Н. Щуковская, В.В. Фирстова, А.Л. Кравцов и др. // *Проблемы особо опасных инфекций*. – Саратов. – 2007. – Вып. 93. – С. 81–84.

97. Паркер, Ч. В. Медиаторы: высвобождение и функции // *Иммунология: в 3 т./под ред. У. Пола*. – М. : Мир, 1989. – Т.3.– С.185–206.

98. Патогенез и патологоанатомическая картина чумы, холеры и сибирской язвы: учебное пособие / С.А. Витязева, Т.П. Старовойтова, В.И. Дубровина и др. Иркутск: ФГБУ «НЦРВХ» СО РАМН, 2015. – 72 с.

99. Патоморфологические аспекты доклинических испытаний различных вакцин против чумы, сибирской язвы и холеры / И.В. Исупов, С.А. Бугоркова, В.В. Кутырев. Саратов: ОАО «Приволжское книжное издательство», 2004. – 180 с.

100. Патоморфологические изменения в респираторном отделе легких белых мышей при экспериментальной чуме / С.А. Витязева, Т.П. Старовойтова, Г.Б. Мухтургин и др. // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. – 2015. – Т. 14. № 5 (84). – С. 67–71.

101. Патоморфологические изменения печени белых мышей при экспериментальной чумной инфекции, вызванной *Yersinia pestis* с разным плазмидным составом / В.И. Дубровина, Т.П. Старовойтова, С.А. Витязева и др. // Acta biomedica scientifica. – 2017. Т. 2. – № 2 (114). – С. 69–73.

102. Петров, Р.В. Иммуногены и вакцины нового поколения / Р.В. Петров, Р.М. Хаитов. – М. : ГЭОТАР-Медиа, 2011. – 608 с.

103. Первый случай выделения *Yersinia pestis* subsp. *pestis* в Алтайском горном при родном очаге чумы. Сообщение 1. Микробиологическая характеристика, молекулярно-генетическая и масс-спектрометрическая идентификация изолята / С.В. Балахонов С.В., М.В. Афанасьев, М.Ю. Шестопапов и др. // Проблемы особо опасных инфекций. – 2013. – № 1. С. – 60–65.

104. Петрова, А.В. Эффекторная Yops: особенности экспрессии энтеропатогенными иерсиниями в интрацеллюлярных условиях / А.В. Петрова, В.А. Федорова, З.Л. Девдариани // Успехи современного естествознания – 2005. – № 3. – С. 113–113.

105. Платонов, М.Е. Молекулярно-генетическое изучение разнообразия и микроэволюции *Yersinia pestis*: Дис. ... канд. мед. наук. Оболенск: ГНЦ ПМБ, 2010. – 142 с.

106. Подладчикова, О.Н. Современные представления о молекулярных механизмах патогенеза чумы // Проблемы особо опасных инфекций. – 2017. – № 3. – С. 33–41.
107. Половинкина, В.С. Закономерности формирования резистентности организма под действием искусственного антигенного комплекса на примере *Yersinia pestis* (экспериментальное исследование)»: автореф. дис. ... канд. биол. наук: 14.00.16 – Иркутск. 2018.– 20 с.
108. Правила надлежащей лабораторной практики. Приказ № 199н от 01.04.2016 Министерства здравоохранения РФ.
109. Проточно-цитофлуориметрический анализ цитотоксичности штаммов *Yersinia pestis* / Е.В. Сазанова, Т.П. Шмелькова, А.Л. Кравцов, Т.А. Малюкова, Ю.А. Попов // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2017. – № 6. – С. 3–9.
110. Прохорова, М.И. Методы биохимических исследований / М.И. Прохорова. – Л., 1982. – С. 168–171.
111. Разработка реагента для оценки начальной стадии иммунного ответа на живую чумную вакцину / П.Н. Дерябин, Б.В. Каральник, Т.Г. Денисова // Проблемы особо опасных инфекций. – 2016. – № 2. – С. 102–106.
112. Распространенность триптофанзависимых вариантов *Yersinia pestis* на территории Алтайского горного природного очага чумы / А.И. Логачев, В.М. Корзун, Е.П. Михайлов и др. // Проблемы особо опасных инфекций. – 2012. – № 3 (113). – С. 20–25.
113. Руководство по гистологии. – В 2 т. Т. II, – СПб. : СпецЛит, 2001. – 735 с.
114. Салямов, С.Р. Механизм продукции несекретируемой внеклеточной каталазы клетками *Yersinia pestis* / С.Р. Салямов, Е.К. Гончаров // Биотехнология. – 2008. – № 2. – С.15–20.
115. Самойлов, Л.В. Сравнительное изучение развития клинических форм экспериментальной чумы при аэрогенном и подкожном заражении вирулентными

штаммами *Y. pestis* и их изогенными вариантами с различным плазмидным профилем // Проблемы особо опасных инфекций. – № 3 (97). – 2008. – С. 66–67.

116. Самусев, Р.П. Анатомия и гистология человека. Энциклопедический словарь / Р.П. Самусев. – М. : РИПОЛ классик, 2008. – 784 с.

117. Санитарные правила «Безопасность работ с микроорганизмами I–II групп патогенности (опасности)». СП 1.3.3118-13. – М., 2014. – 195 с.

118. Саяпина, Л.В. Современное состояние вакцинопрофилактики особо опасных инфекций / Л.В. Саяпина, В.П. Бондарев, Ю.В. Олефир // Проблемы особо опасных инфекций. – 2016. – № 2. – С. 107–110.

119. Сидоренко, С. В. Инфекции в интенсивной терапии / С.В. Сидоренко, С.В. Яковлев. – М. : Медицина, 2003. – 206 с.

120. Случай заболевания человека чумой в Кош-Агачском районе Республики Алтай в 2015 г. Сообщение 1. Клинико-эпидемиологические и эпизоотологические аспекты / С.В. Балахонов, А.Ю. Попова, А.И. Мищенко и др. // Проблемы особо опасных инфекций. – 2016. – № 1. – С. 55–60.

121. Современное состояние природных очагов чумы Сибири / С.В. Балахонов, Д.Б. Вержуцкий, В.М. Корзун и др. // Журнал инфекционной патологии. – 2009. – Т. 16, № 3. – С. 16–20.

122. Специфичность иммуномодулирующего действия эндотоксина *Yersinia pestis* / В.И. Тынянова, В.П. Зюзина, Г.В. Демидова, Е.П. Соколова // Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. – 2016. – № 3. – С. 104–112.

123. Сравнительная характеристика антиокислительных ферментов штаммов *Yersinia pestis* различных подвидов и *Yersinia pseudotuberculosis* / Н.А. Видяева, А.В. Гаева, Л.М. Куклева и др. // Проблемы особо опасных инфекций. – 2008. – вып. 96. – С. 29–32.

124. Сравнительное морфологический анализ экспериментальной чумной инфекции, обусловленной *Yersinia pestis* штаммами с различной генетической характеристикой / С.А. Бугоркова, В.Е. Куклев, Т.В. Бугоркова и др. // Проблемы особо опасных инфекций. – № 4 (98). – 2008. – С. 49–53.



125. Структурно-функциональный анализ криптических плазмид штаммов *Yersinia pestis* из двух природных очагов чумы России / Е.Г. Оглодин, Г.А. Ерощенко, Л.М. Куклева и др. // Проблемы особо опасных инфекций. – № 4. – 2015. – С. 82–85.
126. Супероксиддисмутазы чумного микроба / О.А. Куликов, В.И. Дробков, И.В. Дармов и др. // Вестн. Рос. АМН. – 1996. – № 6. – С. 45–49.
127. Татарников, С.А. Роль бактерицидных механизмов фагоцитоза *Francisella tularensis* разных подвидов в патогенезе туляремии: автореф. дис. ... канд. мед. наук: 14.00.16. – Иркутск. – 2010. – 21 с.
128. Тотолян, А.А. Клетки иммунной системы / А.А. Тотолян, И.С. Фрейдлин. СПб: Наука, 2000. – 232 с.
129. Тувинский природный очаг чумы / под ред. С.В. Балахонова, Д.Б. Вержуцкого. – Иркутск: Изд-во ИГУ, 2019. – 286 с.
130. Учитель, И. Я. Макрофаги в иммунитете / И.Я. Учитель. – М. : Наука, 1978. – 199 с.
131. Фаллер, Д.М. Молекулярная биология клетки. Руководство для врачей / Д.М. Фаллер, Д. Шилдс // Пер. с англ. М. : Изд-во БИНОМ, 2012. – 256 с.
132. Фирстова, В.В. Экспериментально-иммунологическое обоснование выбора стратегии оценки поствакцинального иммунитета против чумы и туляремии: автореф. дисс. докт. биол. наук: 14.03.09. – Оболенск. – 2015. – 42 с.
133. Фирстова, В. В. Иммунологические аспекты чумы / В.В. Фирстова, И.А. Дятлов, А. В. Караулов // Иммунология. – 2016. – № 1. – С. 61–63.
134. Фрейдлин, И. С. Методы изучения фагоцитирующих клеток при оценке иммунного статуса человека. Учебное пособие / И.С. Фрейдлин. – Л., 1986. – 37 с.
135. Фурсов, В.В. Структурная организация плазмиды пестициногенности чумного микроба: автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.00.07.– Саратов. – 1984. – 25 с.

136. Хаитов, Р.М. Аллергология и иммунология. Национальное руководство Р.М. Хаитов // под ред. Р. М. Хаитова, Н. И. Ильиной. – М. : ГЭОТАР-Медиа, 2009. – 656 с.
137. Хаитов, Р. М. Иммунология: учебник / Р.М. Хаитов // 3-е изд., перераб. и доп. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2016. – 496 с.
138. Хаитов, Р.М. Иммунология: структура и функции иммунной системы: учебное пособие / Р.М. Хаитов // М.: ГЭОТАР-Медиа, 2013. – 280 с.
139. Цаплина, О.А. Фагоцитоз патогенных бактерий: модификация клеточных процессов бактериальными эффекторами // Цитология. – 2013. – 55 (2). – С. 83–91.
140. Ценева, Г.Я. Молекулярные аспекты вирулентности иерсиний / Г.Я. Ценева, Н.Ю. Солодовникова, Е.А. Воскресенская // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2002. – Т. 4, № 3. – С. 248–266.
141. Чума: вопросы патогенеза и иммуногенеза / В.И. Дубровина, Ж.А. Коновалова, С.А. Витязева и др. // Иркутск : ИНЦХТ. – 2016. – 56 с.
142. Шевак, И. М. Макрофаги и другие вспомогательные клетки / И.М. Шевак // Иммунология. М. : Мир, 1987. – Т. 1. – С. 115–172.
143. Шмелькова, Т.П. Взаимодействие чумного микроба и его антигенов с клетками крови человека *in vitro*: автореф. дис. ... канд. биол. канд. // Саратов, 2009. – 26 с.
144. Эндотоксин *Yersinia pestis*: особенности структуры, рецепции и механизмов индукции цитопатогенных эффектов (обзор) / Г.А. Афанасьева, Н.П. Чеснокова, С.М. Дальвадянц и др. // Проблемы особо опасных инфекций. – Саратов – 2008 – № 4(98) – С. 43–48.
145. Эпизоотическая активность природных очагов чумы Российской Федерации в 2015 г. и прогноз на 2016 г. / Н.В. Попов, В.Е. Безсмертный, А.Н. Матросов и др. // Проблемы особо опасных инфекций. – 2016. – № 1. – С. 13-19.
146. Ющук, Н.Д. Лекции по инфекционным болезням / Н.Д. Ющук, Ю.Я. Венгеров. – М. : ВУНМЦ, 1999. – 452 с.

147. Ярилин, А.А. Иммунология: учебник. – М: ГЭОТАР-Медиа, 2010. – 752 с.
148. A *Yersinia pestis* IpxM-mutant live vaccine induces enhanced immunity against bubonic plague in mice and guinea pigs / V.A. Feodorova, L.N. Pan'kina, Savostina E. P. et al. // *Vaccine*. – 2006. – Vol. 25, № 44. – P. 7620–7628.
149. Amedei, A. Role of immune response in *Yersinia pestis* infection / A. Amedei, E. Niccolai, L. Marino, M.M. D'Elios // *J. Infect. Dev. Ctries*. – 2011. – № 5 (9). – P. 628–639.
150. Anisimov, A.P. Intraspecific diversity of *Yersinia pestis* / A.P. Anisimov, L.E. Linder, G.B. Pier // *Clin. Microbiol. Rev.* – 2004. – Vol. 17, № 2. – P. 434–464.
151. Anisimov, A.P. *Yersinia pestis* vole's strains: taxonomy, phylogeography, polymorphisms of pathogenicity factors and selective virulence / A.P. Anisimov, E.A. Krasil'nikova, A.S. Vagaiskaya et al. // *Infect. and immunity*. 2017. – Vol 8, № 4. – P. 628.
152. Balakhonov, S.V. Detection of *pla*, *pst1* and *caf1* gene nucleotide sequences on cryptic plasmide 33 kb of *Yersinia pestis* strains from Tuva plague focus / S.V. Balakhonov // *Abst.8th Int.Symp. on Yersinia*. – Turku, Finland, 2002. – P. 78–79.
153. Caspase-3 mediates the pathogenic effect of *Yersinia pestis* YopM in liver of C57BL/6 mice and contributes to YopM's function in spleen / Z. Ye, A.A. Gorm, A.M. Uittenbogaard, et al. // *PLoS ONE*. – 2014. – Vol. – 9, № 11: e110956.
154. Cell-mediated protection against pulmonary *Yersinia pestis* infection / Parent M. A., Berggren K. N., Kummer L. W. et al. // *Infect. Immun.* – 2005. – Vol. – № 11. – P. 7304–7310.
155. Characterization of pPCP1 Plasmids in *Yersinia pestis* Strains Isolated from the Former Soviet Union / C. Rajanna, T. Revazishvili, M.H. Rashid et al. // *International Journal of Microbiology*. – 2010. – Vol. 2010. – 9 p.
156. Cytokine-mediated programmed proliferation of virus-specific CD8(+) memory T cells / H.P. Raué, C. Beadling, J. Haun, M. K. Slifka // *J. Immunity*. – 2013. – Vol. 38(1). – P. 131–9.

157. Current Status of the Sari-Dzhas Natural Focus of Plague / G. Sariyeva, Z. Abdel, A. Shabunin et al. // Kyrgyzstan: Epizootic Activity and Marmot Population Vector Borne Zoonotic Dis. 2018. – Vol. 18. – № 10. – P. 524–532.

158. Defective innate cell response and lymph node infiltration specify *Yersinia pestis* infection / F. Guinet, P. Avé, L. Jones et al. // PLoS ONE. – 2008. – Vol. 3, № 2. – P. 1688.

159. Deletion of Braun lipoprotein and plasminogen-activating protease-encoding genes attenuates *Yersinia pestis* in mouse models of bubonic and pneumonic plague / C.J. van Lier, J. Sha, M.L. Kirtley et al. // Infect. Immun. – 2014. – № 82(6). – C. 2485–503.

160. Dennis, D.T. Plague Manual: Epidemiology, Distribution, Surveillance / D.T. Dennis, K.L. Gage, N. Gratz // Geneva: World Health Organization, 1999. – 171 p.

161. Determination of the virulence of the pigmentation-deficient and pigmentation-/plasminogen activator-deficient strains of *Yersinia pestis* in non-human primate and mouse models of pneumonic plague / Welkos S., Pitt M. L. M., Martinez M. et al. // Vaccine. – 2002. – Vol. 20. – № 17–18. – P. 2206–2214.

162. Emerging and Endemic Pathogens / A.M. Aikimbayev, J.Y. Bekenov, T.V. Meka-Mechenko // The Epidemiological Surveillance of Highly Pathogenic Diseases in Kazakhstan. In: O'Connell K., Skowronski E., Sulakvelidze A., Bakanidze L. (eds) NATO Science for Peace and Security Series A: Chemistry and Biology. – 2010. – Vol. 00. – P. 15–20.

163. Epizootic Activity of Natural Plague Foci of the Russian Federation in 2008–2017 and Forecast for 2018 / N.V. Popov, A.A. Kuznetsov, A.N. et al. // Problems of Particularly Dangerous Infections. – 2018. – № 1. – P. 50–55.

164. Further characterization of a highly attenuated *Yersinia pestis* CO92 mutant deleted for the genes encoding Braun lipoprotein and plasminogen activator protease in murine alveolar and primary human macrophages / van Lier C.J., Tiner B.L., Chauhan S., Motin V.L., Fitts E.C., Huante M.B., Endsley J.J., Ponnusamy D., Sha J., Chopra A.K. // Microb. Pathog. 2015; 80:27–38.

165. Gamma interferon, tumor necrosis factor alpha and nitric oxide synthase 2, key elements of cellular immunity, perform critical protective functions during humoral defense against lethal pulmonary *Yersinia pestis* infection / M.A. Parent, L.B. Wilhelm, L.W. Kummer et al. // *Infect. Immun.* – 2006. – Vol. 74, № 6. – P. 3381–3386.
166. Han, Y. Physiological and regulatory characterization of KatA and KatY in *Yersinia pestis* / Y. Han, J. Geng, Y. Qiu // *DNA Cell Biol.* – 2008. – № 8. – P. 453–462.
167. Huang, X-Z. Current trend in plague research: from genomics to virulence / X-Z. Huang, M. Nikolich, L. Lindler // *Clin. Med & Research.* – 2006. – Vol. 4, № 3. – P. 189–199.
168. Human monoclonal antibodies to *Pseudomonas aeruginosa* alginate that protect against infection by both mucoid and nonmucoid strains / G.B. Pier, D. Boyer, M. Preston et al. // *J. Immunol.* – 2004 – Vol. 173, № 9. – P. 5671–5678.
169. Humoral and cellular immune responses to *Yersinia pestis* infection in long-term recovered plague patients / Li B., Du C., Zhou L. et al. // *Clin. Vaccine Immunol.* – 2012. – Vol. 19. – № 2. P. – 228–234.
170. IL-17 contributes to cell-mediated defense against pulmonary *Yersinia pestis* infection / Lin J.-S., Kummer L. W., Szaba F. M., Smiley S. T. // *J. Immunol.* – 2011. – Vol. 186. – № 3. – P. 1675–1684.
171. Imaging of bubonic plague dynamics by *in vivo* tracking of bioluminescent *Yersinia pestis* / Nham T., Filali S., Danne C., Derbise A., Carniel E. // *PLoS ONE.* – 2012. – № 7(4). – e34714.
172. Immunological Markers that Correlate with Protection Immunity Against Tularemia Infection / V.V. Firstova, A.N. Mokrievich, V.M. Pavlov, A.A. Gorbatov, S.F. Biketov, I.A. Dyatlov // *Advances in Experimental Medicine and Biology.* – 2014, N 808. – P. 15–23.
173. Inheritance of the lysozyme inhibitor Ivy was an important evolutionary step by *Yersinia pestis* to avoid the host innate immune response / A. Derbise, F. Pierre, M. Merchez et al. // *J. Infect. Dis.* – 2013. – Vol. 207, № 10. – P. 1535–1543.

174. Intranasal prophylaxis with CpG oligodeoxynucleotide can protect against *Yersinia pestis* infection / A.J. Hickey, J. Lin, L.W. Kummer et al. // *Infect Immun.* – 2013. – Vol. 81, N 6. – P. 2123–2132.
175. Invasion of epithelial cells by *Yersinia pestis*: evidence for a *Y. pestis* specific invasion / C. Cowan, H.A. Jones, Y.H. Kaya et al. // *Infect Immun.* – 2000 – Vol. 68. – № 8. – P. 4523–4530.
176. Involvement of CD8+ T cell-mediated immune responses in LcrV DNA vaccine induced protection against lethal *Yersinia pestis* challenge / Wang S., Goguen J. D., Li F., Lu S. // *Vaccine.* – 2011. – Vol. 29, № 39. – P. 6802–6809.
177. Iwasaki, A. Control of adaptive immunity by the innate immune system / A. Iwasaki, R. Medzhitov // *Nat. Immunol.* – 2015. – Vol. 16, № 4. – P. 343–353.
178. Kawai, T. The roles of TLRs, RLRs and NLRs in pathogen recognition / T. Kawai, S. Akira // *Int. Immunol.* – 2009. – Vol. 21, № 4. – P. 317–337.
179. Keiser, T. Factor affecting the isolation of CCC DNA from *str. lividans* and *E. coli* // *Plasmid.* – 1984. – Vol. 12 – № 1. – P. 19–37.
180. Ke, Y. *Yersinia pestis*: mechanisms of entry into and resistance to the host cell / Y. Ke, Z. Chen, R. Yang // *Front Cell. Infect. Microbiol.* – 2013. – № 3. – C. 106.
181. Kinetics of Innate Immune Response to *Yersinia pestis* after Intradermal Infection in a Mouse Model / C.F. Bosioa, C.O. Jarretta, D. Gardnerb et al. // *Infection and Immunity.* – 2012. – Vol. 80, № 11. – P. 4034–4045.
182. Klein, K. Elucidation of Mechanisms of *Yersinia pestis* Survival in Macrophages by Examination of Phagosomal Acidification and Negative Selection Screening: [Электронный документ] / K. Klein // *Stony book theses. Dissertation.*-URL: [http://static.akipress.org/docs/2012-11-21\\_zdorovie.pdf](http://static.akipress.org/docs/2012-11-21_zdorovie.pdf). (дата обращения: август 2009).
183. Kockritz-Blickwede, M. Innate immunity turned inside-out: antimicrobial defense by phagocyte extracellular traps / M. Kockritz-Blickwede, V. Nizet // *J. Mol. Med.* – 2009. – Vol. 87, № 8. – P. 775–783.

184. Lawrenz, M.B. Acquisition of omptin reveals cryptic virulence function of autotransporter YapE in *Yersinia pestis* / Lawrenz M.B., Pennington J., Miller V.L. // *Mol. Microbiol.* – 2013. – № 89(2). – P. 276–287.
185. Li, B. Interaction between *Yersinia pestis* and host immune system / B. Li, R. Yang // *Infection and Immunity.* – 2008. – Vol. 76, № 5. – P. 1804–181.
186. Live-attenuated *Yersinia pestis* vaccines / X. Wang, X. Zhang, D. Zhou et al. // *Expert Rev. Vaccines.* – 2013. – Vol. 12, N 6. – P. 677–686.
187. Manipulation of interleukin1 $\beta$  and interleukin-18 production by *Yersinia pestis* effectors YopJ and YopM and redundant impact on virulence / Ratner D., Orning M.P., Starheim K.K., Marty-Roix R., Proulx M.K., Goguen J.D., Lien E. // *J. Biol. Chem.* – 2016. – Vol. 291, № 19. – P. 9894–9905.
188. Medina, E. Neutrophil extracellular traps: a strategic tactic to defeat pathogens with potential consequences for the host / E. Medina // *J. Innate immunity.* – 2009. – Vol. 1, №. 3. – P. 176–180.
189. Mikula, K.M. *Yersinia* infection tools – characterization of structure and function of adhesions / K.M. Mikula, R. Kolodziejczyk, A. Goldman // *Front. Cell. Infect. Microbiol.* – 08 January 2013 | doi: 10.3389/fcimb.2012.00169.
190. Misch, E.A. Toll-like receptor polymorphisms and susceptibility to human disease / E.A. Misch, Hawn T.R. // *Hawn Clinical Science.* – 2008. – Vol. 114 (5). – P. 347–60.
191. Mizgerd, J.P. Acute lower respiratory tract infection / J.P. Mizgerd // *The new engl and j. of medicine.* – 2008. – Vol. 358, № 7. – P. 716–727.
192. Molecular characterization of KatY (antigen 5), a thermoregulated chromosomally encoded catalase-peroxidase of *Yersinia pestis* / E. Garcia, Y.A. Nedialkov, J. Elliott, V.L. Motin et al. // *J. Bacteriol.* – 1999. – № 181. – P. 3114–3122.
193. Nakajima R., Brubaker R. R. Association between virulence of *Yersinia pestis* and suppression of gamma interferon and tumor necrosis factor alpha // *Infect. Immun.* – 1993. Vol. 61. – № 1. – P. 23–31.
194. Neutralization of *Yersinia pestis*-mediated macrophage cytotoxicity by anti-LcrV antibodies and its correlation with protective immunity in a mouse model of bu-

bonic plague / Zauberman A., Cohen S., Levy Y. // *Vaccine*. – 2008. – Vol. 26, № 13. – P. 1616–1625.

195. Pattern recognition by Toll-like receptors / S. Bauer, T. Muller, S. Hamm // *Adv. Exp. Med. Biol.* – 2009. – № 653. – P. 15–34.

196. Perry, R.D., Bearden S.W. Isolation and confirmation of *Yersinia pestis* mutants exempt from select agent regulations / R.D. Perry, S.W. Bearden // *Curr. Protoc. Microbiol.* 2008. – Ch. 5, U. 5B.2.

197. Pha, K. *Yersinia* type III effectors perturb host innate immune responses / K. Pha, L. Navarro // *World J. Biol. Chem.* – 2016. – Vol. 7, № 1. – P. 1–13.

198. Plague as a biological weapon: medical and public health management / Inglesby T. V., Dennis D. T., Henderson D. A. et al. // *JAMA*. – 2000. – №. 283. – P. 2281–2290.

199. Positive T cell co-stimulation by TLR7/8 ligands is dependent on the cellular environment / D. Richardt-Pargmann, M. Wechsler, A.M. Krieg et al. // *Immunobiology*. – 2011. – Vol. 216, № 1–2. – P. 12–23.

200. Presentation of a viral T cell epitope expressed in the CDR3 region of a self immunoglobulin molecule / H. Zaghouani, R. Steinman, R. Nonacs et al. // *Science*. – 1993. – Vol. 259, № 5092. – P. 224–227.

201. Reciprocal control of T helper cell and dendritic cell differentiation / Rissoan M. C., Soumelis V., Kadowaki N. et al. // *Science*. – 1999. – Vol. 283. – № 5405. – P. 1183–1186.

202. Recognition of CpG oligodeoxynucleotides by human Toll-like receptor 9 and subsequent cytokine induction / S. Suwarti, T. Yamazaki, S. Chechetka et al. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2013. – Vol. 430, № 4. – P. 1234–1239.

203. Resistance to *Yersinia pestis* Infection Decreases with Age in B10.T(6R) Mice / N.D. Lambert, D.M. Langfitt, M.L. Nilles et al. // *Infection and Immunity*. – 2011. – Vol. 79, № 11. – P. 4438–4446.

204. Selective protective potency of *Yersinia pestis*  $\Delta$ nlpD mutants / S.V. Dentovskaya, S.A. Ivanov, P.Kh. Kopylov et al. // *Acta Naturae*. – 2015. – Vol. 7. – № 1. – P. 102–108.



205. Shannon, J.G. Dermal Neutrophil, Macrophage and Dendritic Cell Responses to *Yersinia pestis* Transmitted by Fleas / J.G. Shannon, C.F. Bosio, B.J. Hinnebusch // PLoS Pathog. – 2015. – Vol. 11. – № 3. – P. e1004734.
206. Smiley, S.T. Current challenges in the development of vaccines for pneumonic plague / S.T. Smiley // Expert. Rev. Vaccines. – 2008. – Vol. 7, № 2. – P. 209–221.
207. T cells play an essential role in anti-F1 mediated rapid protection against bubonic plague / Y. Levy, Y. Flashner, A. Tidhar et al. // Vaccine. – 2011. – Vol. 29, № 40. – P. 6866–6873.
208. The outer membrane protein A (OmpA) of *Yersinia pestis* promotes intracellular survival and virulence in mice / S.S. Bartra, X. Gong, C.D. Lorica et al. // Microb. Pathog. – 2012 – Vol. 52, № 1. – P. 41–46.
209. The plasminogen activator Pla of *Yersinia pestis* utilizes murine DEC-205 (CD205) as a receptor to promote dissemination / Zhang S., Park C.G., Zhang P., Bartra S.S., Plano G.V., Klena J.D., Skurnik M., Hinnebusch B.J., Chen T. // J. Biol. Chem. – 2008. – Vol. 283(46). – P.31511–31521.
210. The RcsCB His-Asp phosphorelay system is essential to overcome chlorpromazineinduced stress in *Escherichia coli* II // A. Conter, R. Sturny, C. Gutierrez, K. Cam // J. Bacteriol. 2002. – Vol. 184. – P. 2850–2853.
211. The *Yersinia pestis* caf1M1A1 fimbrial capsule operon promotes transmission by flea bite in a mouse model of bubonic plague / F. Sebbane, C. Jarrett, D. Gardner et al. // Infect. Immun. – 2009. – Vol. 77, № 3. – P. 1222–1229.
212. Temporal global changes in gene expression during temperature transition in *Yersinia pestis* / V.L. Motin, A.M. Georgescu, J.P. Fitch et al. // J. Bacteriol. – 2004. – № 186. – P. 6298–6305.
213. Temporal Progression of Pneumonic Plague in Blood of Nonhuman Primate: A Transcriptomic Analysis / R. Hammamieh, S. Muhie, R. Borschel et al. // PLoS ONE. – 2016. – Vol. 11, № 3. – P. e0151788.
214. Toll-like receptor 9 affects severity of IgA nephropathy / Suzuki H., Suzuki Y., Narita I. et al. // Am. Soc. Nephrol. – 2008. – Vol. 19 (12): 2384– 95.

215. Transit through the flea vector induces a pretransmission innate immunity resistance phenotype in *Yersinia pestis* / Vadyvaloo V., Jarrett C., Sturdevant D.E., Sebbane F., Hinnebusch B.J. // PLoS Pathog. – 2010. – № 6(2). – P. e1000783.
216. V antigen of *Yersinia pestis* inhibits neutrophil chemotaxis / Welkos S., Friedlander A., McDowell D. et al. // Microb. Pathol. – 1998. – Vol. 24. – № 3. – P. 185–96.
217. Variability of the protein sequences of LcrV between epidemic and atypical rhamnose-positive strains of *Yersinia pestis* / A.P. Anisimov, E.A. Panfertsev, T.E. Svetoch, S.V. Dentovskaya // Adv. Exp. Med. Biol. – 2007. – Vol. 603. – P. 23–27.
218. Verma, S.K. A recombinant trivalent fusion protein F1-LcrV-HSP70(II) augments humoral and cellular immune responses and imparts full protection against *Yersinia pestis* / S.K. Verma, L. Batra, U. Tuteja // Front. Microbiol. – 2016. – Vol. 7. – P. 1053–1063.
219. Wagner, H. The immunobiology of the TLR9 subfamily. Trends Immunol. 2004. – Vol. 25. – № 7. – 381–386.
220. Wren, B.W. The *Yersiniae* – a model genus to study the rapid evolution of bacterial pathogens / B. W. Wren // Nat. Rev. Microbiol. – 2003. – Vol. 1, № 1. – P. 55–64.
221. Une, T., Brubaker, R. R. Roles of V antigen in promoting virulence and immunity in *Yersiniae* / T. Une, R.R. Brubaker // J. Immunol. – 1984. – Vol. 133, № 4. – P. 2226–2230.
222. *Yersinia*-induced apoptosis in vivo aids in the establishment of a systemic infection of mice / Monack D.M., Mecsas J., Bouley D., Falkow S. // J. Exp. Med. – 1998. – Vol. 188. – P. 2127–2137.
223. *Yersinia pestis*: retrospective and perspective / editors R. Yang, A. Anisimov // 2016. – 391 p.
224. *Yersinia pestis* subverts the dermal neutrophil response in a mouse model of bubonic plague / Shannon J.G., Hasenkrug A.M., Dorward D.W., Nair V., Carmody A.B., Hinnebusch B.J. // mBio. – 2013. – № 4(5). – P. e00170–13.

225. *Yersinia pestis* survival and replication within human neutrophil phagosomes and uptake of infected neutrophils by macrophages / Spinner J.L., Winfree S., Starr T., Shannon J.G., Nair V., Steele-Mortimer O., Hinnebusch B.J. // J. Leukoc. Biol. – 2014. – Vol. 95(3). – P. 389–398.

226. *Yersinia pestis* two-component gene regulatory systems promote survival in human neutrophils / J.L. O’Loughlin, J.L. Spinner, S.A. Minnich, S.D. Kobayashi // Infect. Immun. – 2010 – № 78(2). C. – 773–782.

227. *Yersinia pestis* type-three secretion system-dependent inhibition of human polymorphonuclear leukocyte function / J.L. Spinner, J.A. Cundiff, Kobayashi S.D. // Infect Immun. – 2008. – Vol. 76, № 8. – P. 3754–3760.

228. *Yersinia pestis* targets neutrophils via complement receptor 3 / P.M. Merritt, T. Nero, L. Bohman, S. Felek, E.S. Krukoniš, M.M. Marketon // Cell. Microbiol. – 2015. – Vol. 17, № 5. – P. 666–687.

229. *Yersinia*’s stratagem: targeting innate and adaptive immune defense / J. Heesemann, A. Sing, K. Tru“ lzsch // Curr. Opin. Microbiol. – 2006. – № 9. – P. 55–61.

230. Yethon, J.A., Whifield, C. Lipopolysaccharide is a target for the development of novel therapeutics in Gram-negative bacteria // Curr. Drug Targets Infect. Disord. – 2001. – Vol. 1. – P. 91–106.