

На правах рукописи

ВАГАЙСКАЯ АНАСТАСИЯ СЕРГЕЕВНА

БАКТЕРИАЛЬНЫЕ ТЕНИ *Yersinia pestis*

1.5.11. Микробиология

1.5.6. Биотехнология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Оболенск – 2023

Работа выполнена в Федеральном бюджетном учреждении науки «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека Российской Федерации

Научный руководитель:

Дентовская Светлана Владимировна, доктор медицинских наук, Федеральное бюджетное учреждение науки «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека Российской Федерации, лаборатория микробиологии чумы отдела особо опасных инфекций, главный научный сотрудник

Официальные оппоненты:

Федорова Валентина Анатольевна, доктор медицинских наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Саратовский государственный университет генетики, биотехнологии и инженерии имени Н.И. Вавилова» Министерства сельского хозяйства Российской Федерации, кафедра «Микробиология и биотехнология», профессор кафедры

Ермолаева Светлана Александровна, доктор биологических наук, Федеральное государственное бюджетное учреждение «Федеральный научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения Российской Федерации, лаборатория экологии возбудителей инфекций, руководитель лаборатории

Ведущая организация:

Федеральное казенное учреждение здравоохранения «Иркутский ордена Трудового Красного Знамени научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека Российской Федерации

Защита диссертации состоится «22» декабря 2023 г. в 14-00 часов на заседании диссертационного совета 64.1.002.01 на базе Федерального бюджетного учреждения науки «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека Российской Федерации по адресу: Территория «Квартал А», д. 24, п. Оболенск, г.о. Серпухов, Московская обл., 142279

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного учреждения науки «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека Российской Федерации

Автореферат разослан «_____» _____ 2023 г.

Учёный секретарь диссертационного совета
кандидат биологических наук

Фурсова Надежда Константиновна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Чума, печально известная зоонозная бактериальная инфекция, вызываемая *Yersinia pestis*, унесла более 200 миллионов человеческих жизней. За чуть более 100 лет с момента открытия ее этиологического агента было предпринято множество попыток разработать вакцину против чумы. Убитые и живые чумные вакцины первого поколения спасли десятки миллионов людей, но имеют ряд недостатков. Чумные вакцины на основе живых аттенуированных штаммов могут вызвать генерализованный инфекционный процесс с летальным исходом у лиц с нарушениями иммунного статуса или метаболическими нарушениями; убитые вакцины неэффективны против легочной чумы (Kroger A.T., 2013; Meyer K.F., 1970). В настоящее время в целом ряде лабораторий продолжается разработка чумных вакцин, однако общепризнанная чумная вакцина до сих пор не лицензирована из-за отсутствия полного соответствия современным требованиям ВОЗ к "профилю целевого продукта против чумы" (Yazdanpanah Y., 2018). Субъединичные вакцины, содержащие только один или два иммунодоминантных антигена, капсульный антиген F1 (Caf1) и/или V антиген (LcrV), не защищают от заражения штаммами, лишенными F1 и/или продуцирующими атипичные изоформы LcrV. Кроме того, будучи высокоэффективными для защиты от гибели мышей, инфицированных типичными штаммами *Y. pestis*, они в меньшей степени протективны для морских свинок и обезьян. В свою очередь водонерастворимый «остаточный» антиген (residue antigen, основной соматический антиген (ОСА), Б антиген) из клеточных стенок иерсиний, индуцирующий клеточное звено иммунитета, надежно защищает морских свинок и обезьян, но малоэффективен для мышей (Бывалов А.А. и соавт., 2005; Бывалов А.А. и соавт., 2006). Бактериальные тени (БТ) представляют собой пустые оболочки бактерий, которые содержат большинство антигенных маркеров, обнаруживаемых в жизнеспособных микробных клетках (Bläsi U. et al., 1985). Бактериальные тени рассматривают в настоящее время в качестве кандидатных вакцинных препаратов, эффективных адьювантов, а также механизмов доставки РНК- или ДНК-вакцин (Chen H. et al., 2021).

Степень разработанности темы исследования. Технология конструирования полиантигенных вакцин на основе «бактериальных теней» была предложена в конце прошлого века группой австрийских ученых под руководством W. Lubitz (Bläsi U. et al., 1985) и успешно использована на моделях *Vibrio cholerae*, *Salmonella enteritidis*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Pasteurella multocida*, *Bordetella bronchiseptica* и *Yersinia enterocolitica* и др. (Cai K. et al., 2013), но не была адаптирована к чумному микробу.

Конструирование бактериальных теней чумного микроба позволит оценить перспективность использования данной технологии для разработки прототипов инактивированной чумной вакцины, эффективно защищающих от гибели несколько видов лабораторных животных.

Цель работы:

Конструирование и оценка протективной активности бактериальных теней *Yersinia pestis*.

Задачи исследования:

1. Сконструировать набор плазмид, несущих различные комбинации гена белка Е фага фХ174 с кассетами литических генов систем «холин-эндолизин» фага λ или чумного диагностического фага Л-413С, и определить их эффективность на модели кишечной палочки.
2. Получить БТ на основе аттенуированного штамма *Y. pestis* с пониженной

реактогенностью.

3. Оценить гуморальный и клеточный иммунный ответ у мышей и морских свинок на препараты БТ *Y. pestis* и изучить зависимость протективности от степени деструкции пептидогликана клеточной стенки.

4. Определить иммунологическую активность композиции БТ *Y. pestis* и иммунодоминантных антигенов чумного микроба - капсульного антигена F1 (Caf1) и V антигена (LcrV) для мышей и морских свинок.

5. Оптимизировать методические приемы моделирования бубонной чумы у лабораторных животных после введения аттенуированных Δpgm штаммов *Y. pestis* с использованием декстрана железа.

Научная новизна:

Сконструирован набор литических плазмид, несущих различные комбинации гена белка E бактериофага $\phi X174$ с касетами литических генов систем «холин-эндолизин» бактериофага λ или чумного диагностического бактериофага Л-413С.

При сравнительной оценке эффективности фаговых литических ферментов сконструированных плазмид на модели кишечной палочки и чумного микроба получены бактериальные тени с различной степенью редукции пептидогликана клеточной стенки. Установлена наименьшая литическая способность белка E бактериофага $\phi X174$ и максимальная степень деструкции пептидогликана после воздействия холина и эндолизина чумного диагностического бактериофага Л-413С или комбинации белка E, холина и эндолизина бактериофага Л-413С.

Установлено, что гидролиз пептидогликана в составе бактериальных теней чумного микроба сопровождается достоверным повышением протективной активности препарата в отношении морских свинок, коррелирующее с значительным повышением уровней IFN- γ в спленocyтaх животных, иммунизированных препаратом УК-БТ и особенно ЕУК-БТ.

Показано, что моделирование бубонной чумы у беспородных мышей в условиях УББ 2 лаборатории путем подкожного введения штамма *Y. pestis* EV линии НИИЭГ и декстрана железа можно использовать для изучения протективности кандидатных вакцинных препаратов на ранних стадиях разработки.

Теоретическая и практическая значимость исследования:

Получены новые данные о хозяйской специфичности противочумного иммунитета, индуцированного введением препаратов бактериальных теней из штамма чумного микроба, не содержащего основные иммунодоминантные антигены: капсульный антиген F1 (Caf1) и/или V антиген (LcrV), а также влияние степени редуцированности пептидогликана клеточной стенки чумного микроба в составе БТ на напряженность формируемого иммунного ответа у морских свинок.

Предложен новый морфотип БТ – «бактериальные мешочки», характеризующийся отсутствием пептидогликанового каркаса, и выдвинута гипотеза механизмов его формирования.

Обоснован компонентный состав прототипа чумной полигостальной вакцины, включающей препарат БТ из бесплазмидного аттенуированного штамма *Y. pestis* КМ 260(12) $\Delta lpxM/pEYR-E-Y-K$ и иммунодоминантные антигены чумного микроба – капсульный антиген F1 (Caf1) и V антиген (LcrV).

Разработаны основные приемы наработки препарата бактериальных теней из аттенуированных штаммов чумного микроба *Y. pestis* с использованием фаговых литических ферментов. Подготовлены методические рекомендации «Получение бактериальных теней из аттенуированных штаммов *Yersinia pestis*» (утверждены

директором ФБУН ГНЦ ПМБ 31.05.2023 г., протокол № 3) (учрежденческий уровень внедрения).

Оптимизированы методические приемы моделирования бубонной чумы с использованием декстрана железа у лабораторных животных, зараженных аттенуированными *Δprgm* штаммами *Y. pestis*.

Депонированы в Государственную коллекцию патогенных микроорганизмов и клеточных культур «ГКПМ-Оболенск» (п. Оболенск Московской обл.) семь штаммов: *Y. pestis* subsp. *pestis* KM260(12) *ΔlpxM/pEYR'-E-Y-K*, несущий плазмиду *pEYR'-E-Y-K* с геном белка E бактериофага φX174 и кассетой литических генов систем «холин-эндолизин» чумного диагностического бактериофага Л-413С, а также *Escherichia coli* DH5α/*pEYR'*, *E. coli* DH5α/*pEYR'-E*, *E. coli* DH5α/*pEYR'-Y-K*, *E. coli* DH5α/*pEYR'-E-Y-K*, *E. coli* DH5α/*pEYR'-Sam7-R-Rz* и *E. coli* DH5α/*pEYR'-E-Sam7-R-Rz* – штаммы, несущие литические плазмиды *pEYR'*, *pEYR'-E*, *pEYR'-Y-K*, *pEYR'-E-Y-K*, *pEYR'-Sam7-R-Rz* и *pEYR'-E-Sam7-R-Rz*, соответственно (федеральный уровень внедрения).

Материалы диссертационной работы используются при подготовке кадров высшей квалификации (аспирантуре) и для слушателей курсов профессиональной переподготовки и повышения квалификации ФБУН Государственного научного центра прикладной микробиологии и биотехнологии Роспотребнадзора при чтении лекций и проведении практических занятий в рамках основной профессиональной образовательной программы подготовки научно-педагогических кадров в аспирантуре по направлению 15.1. – Биологические науки, профиль 15.1.11. – микробиология и программы дополнительного профессионального образования «Микробиология. Основы биологической безопасности и практика работ с микроорганизмами I-IV групп патогенности».

Методология и методы исследования:

Методология исследования соответствовала поставленным задачам. Предметом исследования явились БТ *Y. pestis* с редуцированным в различной степени пептидогликаном и хозяйская специфичность иммунного ответа у лабораторных животных, индуцированного препаратами БТ. В работе использовали молекулярно-биологические, микробиологические, генетические, иммунобиологические и биотехнологические методы, а также методы статистической обработки данных.

Методология и методы исследования

Штаммы бактерий, бактериофаги. В диссертационном исследовании использовали 19 штаммов бактерий: *E. coli* (n = 8) *Y. pestis* subsp. *pestis* (n = 10) и *Y. pseudotuberculosis* (n = 1), а также бактериофаги λCE6, φX174 и чумной диагностический бактериофаг Л-413.

Лабораторные животные. В экспериментах использовали белых беспородных мышей (19 ± 2) г, а также морских свинок (275 ± 25) г (филиал «Апрелевка» ФГБУН НЦБМТ ФМБА России) в соответствии с ГОСТ 33216-2014 «Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными». Протоколы экспериментов с животными одобрены комитетом по биоэтике ФБУН ГНЦ ПМБ (ВП – 2019/4 и ВП-2021/4).

Микробиологические методы. Микроорганизмы выращивали в жидких или на плотных питательных средах Хоттингера (ФБУН ГНЦ ПМБ), ВНИ (Brain Heart Infusion, NiaMedia, Индия), LB, pH 7,2 (Maniatis T., 1982). Отбор клеток, содержащих рекомбинантные плазмиды, вели на средах с добавлением соответствующих антибиотиков в концентрациях: ампициллин – 100 мкг/мл, канамицин – 40 мкг/мл, хлорамфеникол – 10 мкг/мл.

Препаративное количество БТ получали при культивировании в жидкой обогащенной питательной среде на основе солянокислого гидролизата казеина с содержанием $N_{\text{амин}}$ до 150 мг % следующего состава: дрожжевой экстракт – 15 г/л, глюкозу – 5 г/л (стартовая концентрация) + 5 г/л (подпитка), KH_2PO_4 – 6 г/л, K_2HPO_4 – 3 г/л, $MgSO_4$ – 0,5 г/л, микроэлементы ($MnSO_4$ – 0,6 мкМ, $CuSO_4$ – 1,25 мкМ, $FeSO_4$ – 0,6 мкМ, $ZnSO_4$ – 0,6 мкМ, $Na_3C_6H_5O_7$ – 0,1 мкМ), хлорамфеникол – 20 мг/л, pH 7,0.

Молекулярно-генетические методы. Нокаутные мутанты получали с использованием суицидного вектора (Donnenberg M.S. *et al.*, 1991). Конструирование векторной плазмиды и литических плазмид осуществляли как описано ранее (Dentovskaya S.V. *et al.*, 2021). Передачу литических плазмид в штаммы *E. coli* и *Y. pestis* осуществляли “кальциевым” методом трансформации по S.N. Cohen, A.C.Y. Chang (1973) и методом криотрансформации в модификации А.М. Кокушкина (1983), соответственно.

Биохимические методы. LcrV антиген выделяли из бульонной культуры штамма *E. coli* BL21/pETV-I-3455 и очищали с последовательным использованием гель-фильтрации, анионообменной хроматографии (DEAE TSK 650M) и гидрофобной хроматографии (Копылов П.Х. и соавт., 2019).

Секретируемый капсульный антиген выделяли из надосадочной фракции бульонной культуры штамма *Y. pseudotuberculosis* 11M/pFSK 3/9 путем ее фракционирования сульфатом аммония с последующей хроматографической очисткой (MP 4.2.0219 – 20 «Выделение и очистка F1 антигена чумного микроба»)

Получение бактериальных теней. БТ штаммов *Y. pestis* KM260(12) Δ lpxM/pEYR'-E, *Y. pestis* KM260(12) Δ lpxM/pEYR'-Y-K, *Y. pestis* KM260(12) Δ lpxM/pEYR'-E-Y-K, *Y. pestis* KM260(12) Δ lpxM/pEYR'-S-R-Rz, *Y. pestis* KM260(12) Δ lpxM/pEYR'-E-S-R-Rz получали методом глубинного культивирования в ферментере с рабочим объемом 10 л в жидкой обогащенной питательной среде при уровне аэрации и перемешивания для обеспечения массообмена не ниже 20 % от насыщения по O_2 . При достижении бактериальной культурой оптической плотности (ОП) $\geq 2,0$ ед запускали лизис клеток путем подъема температуры до 42,0 °С в течение 12 – 24 ч. Биомассу отделяли путем центрифугирования при 11000 $\times g$ в течение 15 мин с последующей трехкратной отмывкой холодной дистиллированной водой. Для консервации сырую биомассу ресуспендировали в дистиллированной воде с добавлением мертиолята натрия (0,2 мг/г), разливали в стерильные флаконы и лиофильно высушивали. Полученные препараты БТ назвали Е-БТ, YK-БТ, EYK-БТ, SRRz-БТ и ESRRz-БТ. Контроль стерильности проводили методом прямого посева по ГФ XII, часть 1, стр.125. Препарат считали стерильным при отсутствии роста микроорганизмов во всех образцах.

Просвечивающую электронную микроскопию (ПЭМ) выполняли как описано ранее (Dentovskaya S.V. *et al.*, 2021).

Биологические методы. Беспородных мышей и морских свинок, случайным образом разделенных на группы, на 0 сут и 14 сут иммунизировали подкожно (п/к): препаратами Е-БТ, EYK-БТ, YK-БТ, SRRz-БТ или ESRRz-БТ (10^8 м.к.); экспериментальным препаратом вакцины чумной трёхкомпонентной (ВЧТК), состоящей из препарата бактериальных теней EYK-БТ (10^8 м.к.) и рекомбинантных антигенов чумного микроба – капсульного антигена F1 и V антигена (по 10 мкг), растворенными в 0,2 мл PBS (pH 7,2). В качестве отрицательного контроля (плацебо) использовали группу животных, получивших только раствор PBS. Через 14 сут после последней иммунизации мышей и морских свинок в каждой группе заражали подкожно серийными 10-кратными разведениями двухдневной агаровой культуры штамма *Y. pestis* 231 дикого типа, выращенного при температуре 28 °С (шесть животных на дозу).

Специфическую безопасность определяли по отсутствию токсического действия на организм лабораторных животных при внутрибрюшинном введении ГФ XII, ч. 1., с. 124.

Иммунологическую активность рекомбинантного белка F1 (10 мкг), сорбированного на гидроокиси алюминия (1 : 1), оценивали после двукратного подкожного введения (через 30 сут) животным. Для определения ЛД₅₀ на 30 сут после бустерного введения иммунизированных мышей и морских свинок и животных контрольных групп заражали вирулентным штаммом *Y. pestis* 231.

Способность БТ, F1 или ВЧТК защищать животных от смерти после введения высокой дозы вирулентного штамма, обозначенную как индекс иммунитета (ИИ), рассчитывали, как соотношение:

$$ИИ = ЛД_{50имм} / ЛД_{50инт}$$

где ЛД₅₀ – средняя летальная доза; ЛД_{50имм} – это ЛД₅₀ для животных, иммунизированных исследуемым антигеном; ЛД_{50инт} – это ЛД₅₀ для интактных (не иммунизированных) животных.

Моделирование экспериментальной чумы в условиях УББ 2 лаборатории осуществляли как описано ранее (Вагайская А.С. с соавт., 2020). В качестве источника железа использовали коллоидный раствор декстрана Fe(OH)₃ для внутримышечного введения «Феррум Лек» 50 мг/мл, Словения.

Иммунологические методы. Для оценки титров антител к рекомбинантным белкам и препарату бактериальных теней *Y. pestis* в сыворотках иммунных мышей или морских свинок использовали метод твердофазного ИФА (Егоров А.М. с соавт., 1991). Определение клеточного ответа: анализ стимулированных спленоцитов выполняли как описано ранее (Dentovskaya S.V. et al., 2021).

Статистический анализ. Статистический анализ проводили, используя Graph Pad Prism 6 (GraphPad Software, La Jolla, CA). ЛД₅₀ и 95 % доверительные интервалы вирулентного штамма для иммунизированных и неиммунизированных животных рассчитывали с использованием метода Кербера (Finney D.J., 1978). Сравнение кривых выживаемости проводили с использованием теста логарифмического ранга (Мантела-Кокса). Значение p ниже 0,05 считали значимым.

Положения, выносимые на защиту:

1. Разработанный комплекс методических приемов и сконструированный на основе репликона pA15 набор литических плазмид, несущих под контролем промотора pR' фага λ cI857Sam7 различные комбинации гена белка E фага φX174 с кассетами литических генов систем «холин-эндолизин» фагов λ или чумного диагностического фага Л-413С обеспечивает конструирование изогенных наборов БТ энтеробактерий с различной степенью деструкции клеточной стенки, позволяющих отобрать наиболее перспективные литические конструкции для последующего производства вакцинных препаратов.

2. Бактериальные тени чумного микроба эффективно защищают от гибели морских свинок при заражении вирулентным штаммом *Y. pestis*, а в комбинации с иммунодоминантными антигенами чумного микроба – капсульным антигеном F1 (Caf1) и V антигеном (LcrV) достоверно потенцируют протективность последних как для мышей, так и морских свинок.

3. Моделирование с использованием декстрана железа бубонной чумы у беспородных мышей, зараженных подкожно аттенуированным Δpgm штаммом *Y. pestis*, является безопасным для экспериментатора инструментом идентификации наиболее многообещающих кандидатных вакцинных препаратов, защитный потенциал

которых впоследствии может быть оценен с использованием вирулентных штаммов чумного микроба.

Степень достоверности и апробация результатов

Работа выполнена в Федеральном бюджетном учреждении науки «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека в рамках гранта Российского Научного Фонда № 19-15-00072 «Протективная активность «бактериальных теней» *Yersinia pestis*» (научный руководитель – д.м.н., проф. А.П. Анисимов) (номер регистрации ЕГИСМ АААА-А19-119062690056-9), отраслевых научно-исследовательских программ Роспотребнадзора на 2016–2020 и 2021-2025 гг.: «Проблемно-ориентированные научные исследования в области эпидемиологического надзора за инфекционными и паразитарными болезнями» (номер регистрации ЕГИСМ 116030310013), «Научное обеспечение эпидемиологического надзора и санитарной охраны территории Российской Федерации» (номер регистрации ЕГИСМ 121022500007-6), а также в рамках работы Центра геномных технологий мирового уровня по биобезопасности (грант 075-15-2019-1671 Министерства науки и высшего образования).

Достоверность результатов определяется использованием современных методов, документально регистрирующих изучаемые явления и объекты, достаточным по объему фактическим материалом и наличием соответствующих контролей, а также проведением статистической обработки данных.

Материалы диссертации представлены и обсуждены на шести Всероссийских и международных конференциях: XIII Ежегодном Всероссийском Конгрессе по инфекционным болезням имени академика В.И. Покровского «Инфекционные болезни в современном мире: эволюция, текущие и будущие угрозы» (24-26 мая 2021 г. Москва); IV Всероссийской научно-практической конференции «Актуальные проблемы болезней, общих для человека и животных» (24-26 мая 2021 г. Москва); 24th International Scientific Conference «Current issues on zoonotic diseases» (2021 Ulaanbaatar, Mongolia); XIV Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых и специалистов Роспотребнадзора (22-24 июня 2022 д. Лужки, Московская обл.); Международном симпозиуме «*Yersinia 14*» (26–28 сентября 2022 г. Санкт-Петербург); VII Национальном конгрессе бактериологов (28-29 сентября 2022 г. г. Санкт-Петербург), VIII Национальном конгрессе бактериологов (27-28 сентября 2023 г. г. Москва)

Личное участие автора в получении результатов

Личное участие автора заключалось в анализе литературных данных, планировании экспериментов, в выполнении молекулярно-биологических, микробиологических, биотехнологических и иммунобиологических экспериментов, анализе полученных результатов, в подготовке материалов для публикаций, в представлении устных и стендовых докладов на конференциях. Отдельные разделы работы выполнены совместно с канд. биол. наук М.Е. Платоновым, д-ром мед. наук С.В. Дентовской, канд. биол. наук С.А. Ивановым, канд. биол. наук Комбаровою Т.И., д-ром биол. наук Герасимовым В.Н. На защиту вынесены только те положения и результаты экспериментов, в получении которых роль автора была определяющей.

Публикации

По материалам диссертационной работы опубликовано 13 научных работ, в том числе 5 статей в научных журналах и 8 тезисов в материалах международных и Всероссийских научных конференций.

Объем и структура диссертации

Диссертация изложена на 126 страницах машинописного текста и состоит из следующих разделов: введения, обзора литературы, результатов исследования с их обсуждением, заключения, выводов и списка использованных источников, включающего себя 254 источника, в том числе 5 отечественных и 249 зарубежных. Работа иллюстрирована 20 рисунками и 9 таблицами.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Создание набора литических плазмид для продукции бактериальных теней

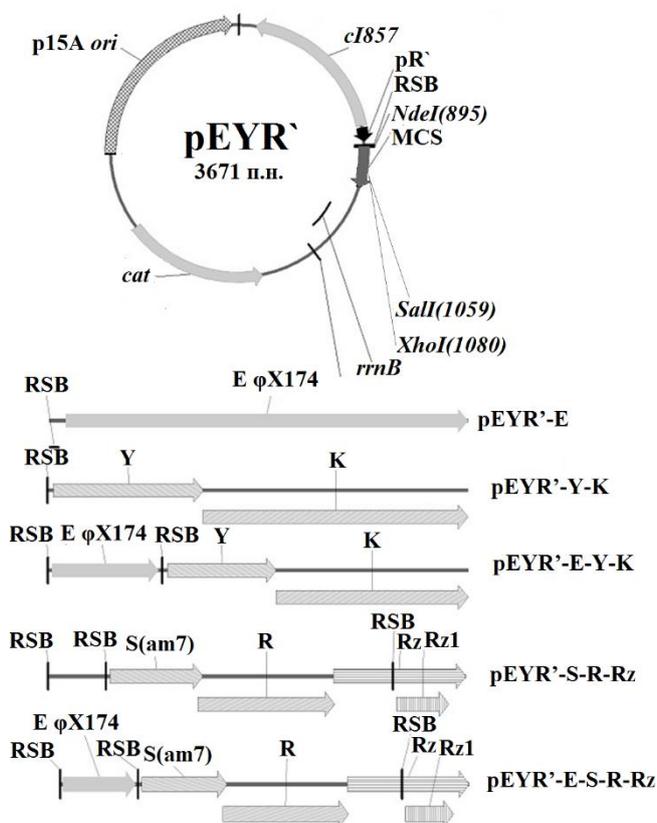


Рисунок 1 – Схематическое изображение векторной плазмиды и лизирующих кассет, использованных в этом исследовании

Лизиса клонировали в сайты клонирования NdeI-XhoI. Для плазмид pEYR'-S-R-Rz, pEYR'-E-Y-K и pEYR'-E-S-R-Rz, S-R-Rz и Y-K гены с собственными сайтами связывания рибосом были клонированы в сайты клонирования SallI-XhoI. Ген E клонировали в сайты клонирования NdeI-SallI.

Получение бактериальных теней на основе штамма *E. coli* DH5α

У полученных в результате трансформации литическими плазмидами производных штамма *E. coli* DH5α изучили способность образовывать БТ. При

Сконструированная плазмида pEYR' (рисунок 1) представляет собой вектор на базе репликаона p15A с копийностью 5-20 копий на клетку, способный реплицироваться в клетках представителей различных видов семейства *Enterobacteriaceae*. Плазмида содержит ген устойчивости к хлорамфениколу *cat* из транспозона Tn9, терминатор транскрипции рибосомальных генов *rrnB E. coli* и вариант промотора бактериофага λ pR (pR') с мутациями в гене белка-репрессора *cI* (*cI857*) и во втором операторе (Jechlinger W. *et al.*, 1999), что позволяет экспрессировать гены при повышении температуры культивирования до 42 °С. В данном векторе pEYR' клонировали все варианты кассет генов литических белков.

Источниками генов холина (Y) и эндолизина (K), гена белка E, а также генов холина (S(am7)), эндолизина (R) и спанинов (Rz и Rz1) являлись чумной диагностический бактериофаг Л-413С, бактериофаг φX174 и бактериофаг λ (*cI857S(am7)*), соответственно. Для плазмид pEYR'-E и pEYR'-Y-K гены

повышении температуры культивирования до 42 °С наблюдали лизис культур штаммов DH5 α /pEYR'-E, DH5 α /pEYR'-Y-K, DH5 α /pEYR'-E-Y-K, DH5 α /pEYR'-E-Sam7-R-Rz, сопровождавшийся снижением оптической плотности и быстрым сокращением числа жизнеспособных клеток (рисунок 2).

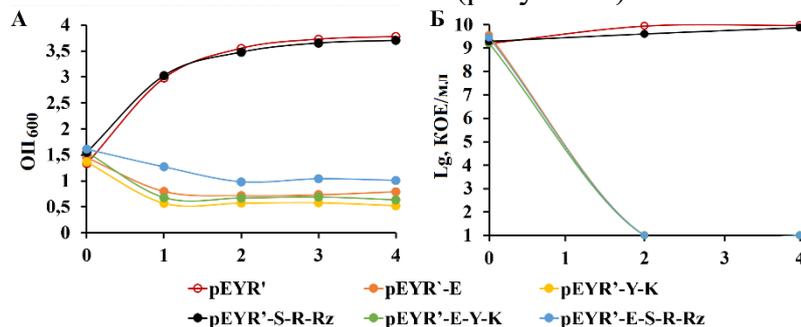


Рисунок 2 – Кинетика лизиса (А) и жизнеспособность (Б) штаммов *E. coli* DH5 α , содержащих различные литические плазмиды при температуре 42 °С

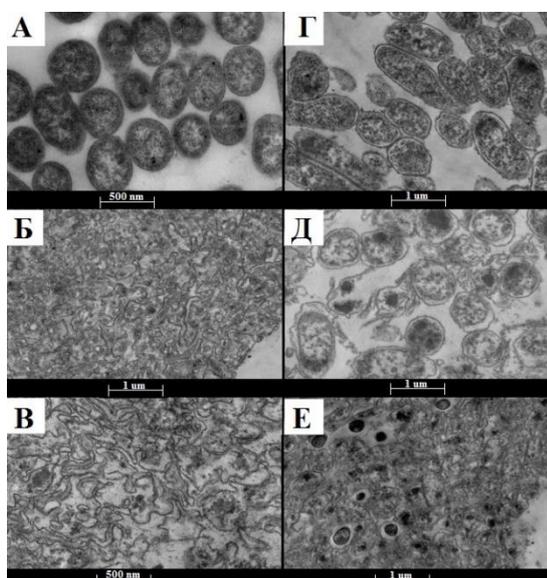


Рисунок 3 – ПЭМ микрофотографии ультратонких срезов клеток штаммов *E. coli*: DH5 α /pEYR' (А), DH5 α /pEYR'-E (Б), DH5 α /pEYR'-Y-K (В), DH5 α /pEYR'-E-Y-K (Г), DH5 α /pEYR'-S-R-Rz (Д), DH5 α /pEYR'-E-S-R-Rz (Е)

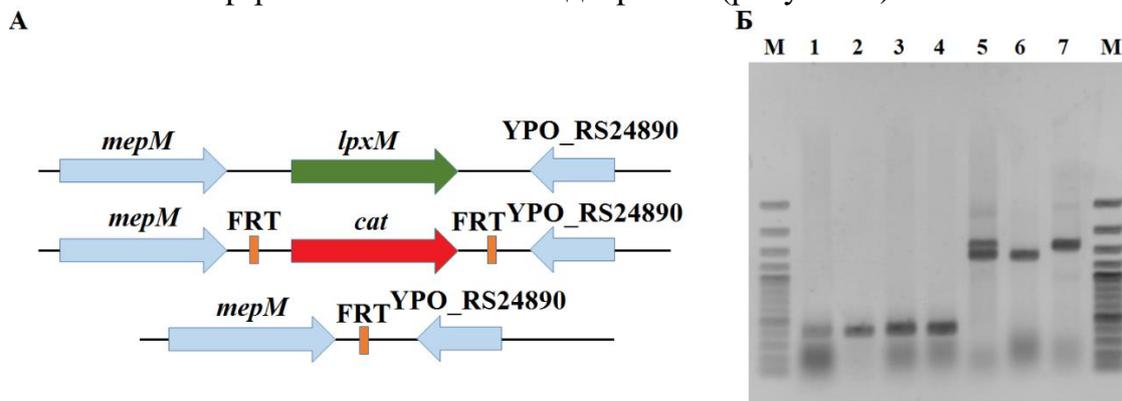
По результатам ПЭМ клетки данных штаммов подверглись различной степени лизиса, сопровождающегося потерей цитоплазматического содержимого, в результате частичного разрушения клеточной стенки (рисунок 3).

Исключение составил лишь штамм, несущий кассету генов Sam7-R-Rz бактериофага λ (*cI857Sam7*). Амбер-мутация в гене холина (*Sam7*) приводит к отсутствию синтеза белка S и накоплению эндолизина R и спанинов Rz и Rz1 в цитоплазме бактериальной клетки. Лизис клеток DH5 α /pEYR'-S-R-Rz практически не наблюдался и бактериальные клетки сохранили интактную структуру после индукции (рисунок 3).

Конструирование штамма *Y. pestis* KM260(12) Δ *lpxM*

Принимая во внимание возможность присутствия жизнеспособных бактерий в препаратах БТ, полученных с использованием как белок-Е-опосредованного лизиса, так и системы холин-эндолизин, в качестве производного выбрали авирулентный штамм *Y. pestis* KM260(12), лишенный трех резидентных плазмид, что вело к аттенуации (Дентовская С.В. с соавт., 2022) и сопровождалось отсутствием синтеза ряда кодируемых белков, включая небезопасные для организма вакцинируемого факторы, такие как активатор плазминогена (Pla) и «мышинный» токсин (Ymt), а также ряд не балластных непротективных антигенов, например Pst, YopE и др. Потерю двух основных иммунодоминантных антигенов F1 и V в дальнейшем компенсировали путем введения в препарат очищенных рекомбинантных белков.

Для получения БТ сконструировали мутантный штамм *Y. pestis* KM260(12) Δ *lpxM* с инактивированным геном лаурилтрансферазы *lpxM*, что привело к синтезу пентаацилированного липополисахарида, демонстрирующего снижение эндотоксической активности, ведущей к понижению общей реактогенности (Anisimov A.P. *et al.*, 2007). Методика конструирования Δ *lpxM* мутанта штамма *Y. pestis* KM260(12) заключалась в инактивации гена *lpxM* с помощью замены его на кассету устойчивости к хлорамфениколу и последующем удалении кассеты из хромосомы с использованием F_lp-рекомбиназы плазмиды pCP20 (рисунок 4).



Б: 1-4 – *Y. pestis* KM260(12) Δ *lpxM* (мутантная аллель, размер ампликона 355 п.н.); 5 – *Y. pestis* KM260(12)/pCVD442442 Δ *lpxM*::*cat* (мерозигота); 6 – *Y. pestis* KM260(12) Δ *lpxM*::*cat* (размер ампликона 1335 п.н.); 7 – исходный штамм *Y. pestis* KM260(12) («дикая» аллель, размер ампликона 1555 п.н.); М – маркер молекулярных масс 100 bp DNA ladder Plus (Fermentas)

Рисунок 4 – Схема конструирования (А) и электрофорез (Б) Δ *lpxM* мутанта штамма *Y. pestis* KM260(12)

Получение бактериальных теней на основе штамма *Y. pestis* KM260(12) Δ *lpxM*

Установлено снижение ОП у всех штаммов чумного микроба с литическими плазмидами после индукции путем повышения температуры с 28 °С до 42 °С. Утрата жизнеспособности культур проходила в течение первых 4-8 ч, за исключением Е-БТ, который потерял жизнеспособность только через 24 ч. Эффективность лизиса при образовании БТ составляла в среднем 99,99 % \pm 0,01 (рисунок 5).

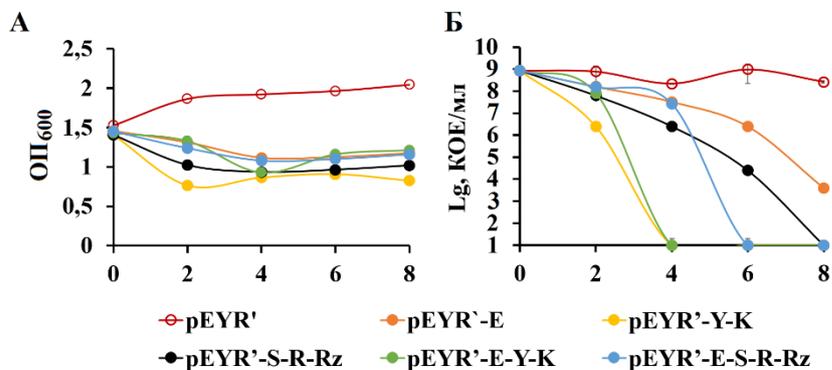


Рисунок 5 – Кинетика лизиса *Y. pestis* KM260 (12) Δ *lpxM*, несущего различные литические плазмиды. Лизис контролировали путем измерения ОП₆₀₀ (А) и определения количества КОЕ (Б)

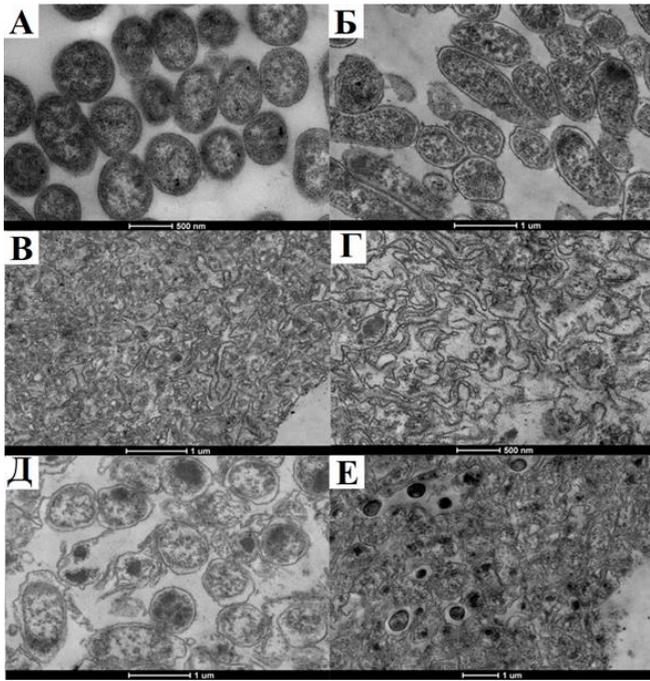
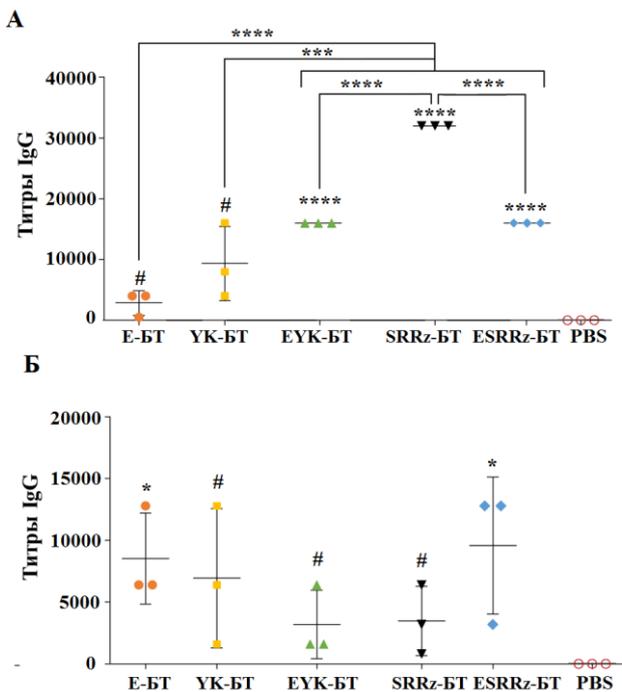


Рисунок 6 – Электронные микрофотографии штаммов *Y. pestis* KM260(12) Δ *lpxM* /pEYR' (А), KM260(12) Δ *lpxM* /pEYR'-Е (Б), KM260(12) Δ *lpxM* /pEYR'-У-К (В), KM260(12) Δ *lpxM* /pEYR'-Е-У-К (Г), KM260(12) Δ *lpxM* /pEYR'-S-R-Rz (Д), KM260(12) Δ *lpxM* /pEYR'-Е-S-R-Rz (Е)

смещало равновесие в смеси в сторону спавшихся мешочков. Утрату жесткости структуры БТ можно объяснить лизисом пептидогликанового скелета (рисунок 6).

Анализ иммунного ответа у лабораторных животных



- $p > 0,05$; * - $p < 0,05$; ** - $p < 0,005$;
 *** - $p < 0,001$; **** - $p < 0,0001$.

Рисунок 7 – Антительный ответ в сыворотках морских свинок (А) и мышей (Б) на препараты БТ

По данным ПЭМ экспрессия гена белка Е приводила к формированию БТ, которые сохраняли форму исходной бактерии. Одновременная экспрессия гена белка Е с генами, кодирующими холин-эндолизинную систему фага Л-413С, вызывала образование структур, напоминающих коллапсированные (схлопнувшиеся) мешочки. Подобные структуры, утратившие жесткость, также образовались в результате экспрессии только генов холин-эндолизина фага Л-413С. Аналогичная холин-эндолизинная система из фага λ , содержащего мутацию в гене холина S и интактные гены R-Rz, кодирующие эндолизин, приводила к образованию смеси БТ как сохранившихся, так и полностью утративших исходную форму, определяемую пептидогликановым каркасом. Добавление белка Е к этой системе

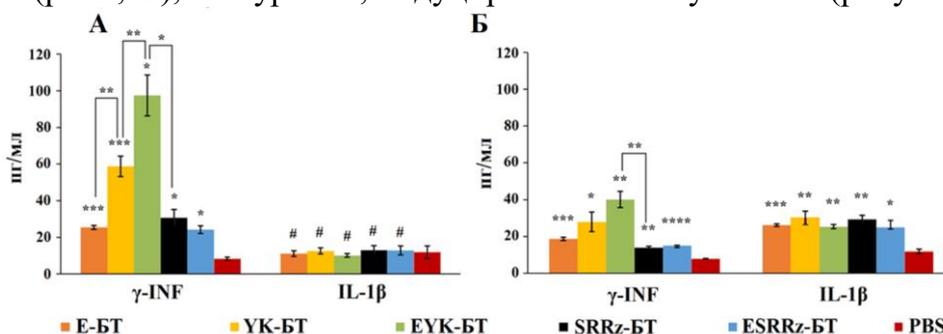
Для изучения иммунологической активности полученных препаратов бактериальных теней чумного микроба морских свинок и беспородных мышей иммунизировали двукратно подкожно с интервалом в 2 нед.

У мышей не обнаружили существенных различий в уровнях анти-БТ IgG антител ($p > 0,05$). У морских свинок самые высокие титры IgG выявили после иммунизации препаратами SRRz-БТ, ЕУК-БТ и ESRRz-БТ. Титры антител в остальных группах морских свинок, вакцинированных препаратами Е-БТ и УК-БТ, были достоверно ниже ($p < 0,001$) (рисунок 7).

При оценке экспрессии IFN- γ лимфоцитами селезенки обнаружили значительное повышение уровней цитокина в группе морских свинок, иммунизированных препаратом УК-БТ,

и особенно в группе, получивших ЕУК-БТ ($p < 0,05$). Способность препаратов БТ индуцировать продукцию IFN- γ у морских свинок была заметно выше, чем у мышей.

Повышение уровней IL-1 β наблюдали у мышей, получавших любой вариант БТ ($p < 0,05$). Во всех других собранных образцах уровни IL-1 β были по крайней мере в два раза ниже ($p < 0,05$), чем уровни, индуцированные БТ у мышей (рисунок 8).



- $p > 0,05$; * - $p < 0,05$; ** - $p < 0,005$; *** - $p < 0,001$; **** - $p < 0,0001$.

Рисунок 8 – Уровни цитокинов лимфоцитов селезенки иммунизированных морских свинок (А) и мышей (Б)

Оценка протективной активности различающихся по степени деструкции пептидогликана вариантов бактериальных теней *Y. pestis* KM260(12) Δ lpxM для лабораторных животных

Для оценки протективного иммунитета, индуцированного вариантами БТ, определили индекс иммунитета (ИИ) – отношение значений ЛД₅₀ для иммунизированных животных к аналогичному показателю для интактных животных. Иммунная система мышей практически не формировала защитный ответ на введение БТ, в то время как морские свинки, напротив, обладали значительным уровнем протективного иммунитета после введения препаратов УК-БТ и ЕУК-БТ. Взятый для сравнения капсульный антиген F1, с другой стороны, обеспечивал надежную защиту от гибели мышей, но не влиял на выживаемость морских свинок (таблица 1).

Таблица 1 – Индекс иммунитета, индуцированного вариантами БТ.

| Животные, иммунизированные БТ / антигеном | Морские свинки | | Мыши | |
|-------------------------------------------|-------------------------------|---------------------------|-------------------------------|---------------------------|
| | ЛД ₅₀ , КОЕ | ИИ | ЛД ₅₀ , КОЕ | ИИ |
| Е | 147 37÷584 | 4,9×10 ¹ | 32 8×126 | 4,6×10 ⁰ |
| У-К | 6813 2154÷27123 | 2,3×10³ | 22 5×86 | 3×10 ⁰ |
| Е-У-К | 146789 36869÷926119 | 4,9×10⁴ | 22 5×86 | 3×10 ⁰ |
| S-R-Rz | 68 17÷271 | 2,3×10 ¹ | 15 4×58 | 2×10 ⁰ |
| Е-S-R-Rz | 147 37÷584 | 4,9×10 ¹ | 46 12÷233 | 6,6×10 ⁰ |
| F1** | 316 79÷1259 | 1,0×10 ² | 100000 25119÷630957 | 1,4×10⁴ |
| PBS | 3 1÷13 | 1×10 ⁰ | 7 2÷27 | 1×10 ⁰ |

* Значения даны как средние ± 95% доверительный интервал.

Полученный феномен пептидогликан-зависимого механизма усиления

защитной активности препаратов БТ с полностью гидролизованным пептидогликаном для морских свинок можно объяснить возможным образованием при гидролизе множества молекул мурамил-дипептида, мельчайших адьювантных активных частей, способных по ранее полученным данным заменять целые убитые микобактериальные клетки в полном адьюванте Фрейнда (Bahr G.M., Chedid L., 1986).

Таким образом, препарат ЕУК-БТ с полностью гидролизованным пептидогликаном вызывает значительно большую защиту от гибели при заражении *Y. pestis* морских свинок по сравнению с классическими БТ и может использоваться в качестве эффективного компонента при разработке безопасной вакцины против чумы для нескольких хозяев (человек, мышь и обезьяна).

Компонентный состав чумной субъединичной вакцины

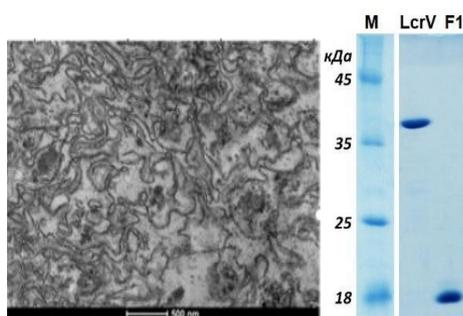
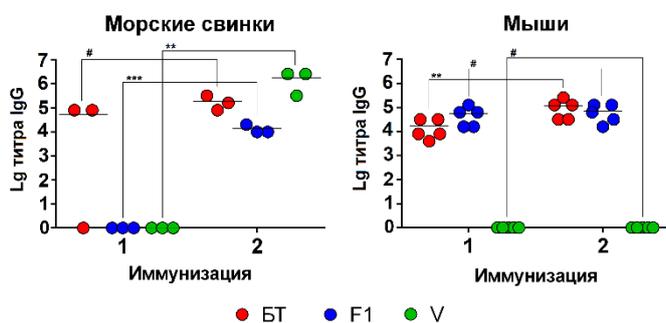


Рисунок 9 – Результаты тестирования подлинности препарата ВЧТК: просвечивающая электронная микроскопия препарата бактериальных теней и ДСН-ПААГ-электрофорез

На следующем этапе к отобранному препарату бактериальных теней ЕУК-БТ добавили иммунодоминантные антигены чумного микроба – капсульный антиген F1 (Caf1) и V антиген (LcrV), для создания прототипа полигостальной вакцины чумной трехкомпонентной (ВЧТК). По результатам трансмиссионной электронной микроскопии в препарате БТ фиксировали потерю цитоплазматического содержимого в результате разрушения цитоплазматической мембраны и клеточной стенки. По результатам вертикального электрофореза F1 антиген чумного микроба обладал молекулярной массой 17,7 кДа и V антиген чумного микроба - молекулярной массой 37 кДа (рисунок 9).

Прототип вакцины чумной трехкомпонентной был стерилизован и безопасен для лабораторных животных (данные не приводятся).

Иммунологическая активность композиции ЕУК-БТ с иммунодоминантными антигенами чумного микроба – капсульным антигеном F1 (Caf1) и V антигеном (LcrV)



— $p > 0.05$, * — $p < 0.05$, ** — $p < 0.005$,
*** — $p < 0.001$

Рисунок 10 – Средние реципрокные титры антител после иммунизации прототипом чумной трехкомпонентной вакцины

Для определения формирования гуморального иммунного ответа на введение ВЧТК беспородных белых мышей и морских свинок иммунизировали подкожно двукратно с интервалом в 14 сут. Подкожное введение препарата ВЧТК стимулировало продукцию антител у лабораторных животных. Отмечали увеличение титров специфических IgG антител к препарату БТ, F1 и V антигенам после второй иммунизации мышей и морских свинок (рисунок 10).

Напряженность иммунитета, индуцированного введением препарата ВЧТК, определяли по способности предохранять от гибели беспородных белых мышей и морских свинок после заражения массивной дозой вирулентного штамма *Y. pestis* 231 и выражали в ЛД₅₀ и индексе иммунитета. Двукратная иммунизация ВЧТК предоставляла защиту от гибели при подкожном заражении беспородных мышей и морских свинок вирулентным штаммом *Y. pestis* 231. Неиммунные мыши и морские свинки контрольных групп, зараженные подкожно 10² КОЕ штамма *Y. pestis* 231, пали к 12 сут и 10 сут наблюдения, соответственно (рисунок 11).

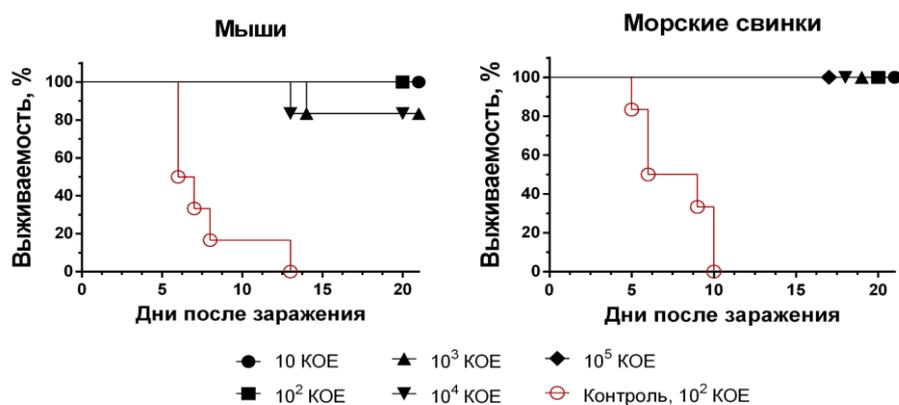


Рисунок 11 – Выживаемость беспородных мышей и морских свинок, двукратно иммунизированных ВЧТК, после подкожного введения вирулентного штамма *Y. pestis* 231

ЛД₅₀ вирулентного штамма *Y. pestis* 231 для мышей и морских свинок, иммунизированных данным препаратом, достоверно отличалась от ЛД₅₀ для контрольных групп лабораторных животных ($p < 0,001$) (таблица 2).

Таблица 2 – Иммунологическая активность ВЧТК

| Препарат | ЛД ₅₀ <i>Y. pestis</i> 231, КОЕ | | Индекс иммунитета (ЛД ₅₀ для иммунизированных / ЛД ₅₀ для интактных животных) | |
|----------|--------------------------------------------|---------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------|
| | Мыши | Морские свинки | Мыши | Морские свинки |
| ВЧТК | $> 3,2 \times 10^4$ | $> 3,2 \times 10^5$ | $> 1,6 \times 10^4$ | $> 1,1 \times 10^5$ |
| Контроль | 2 (1 ÷ 9) | 3 (1 ÷ 13) | 1×10^0 | 1×10^0 |

Влияние железа на остаточную вирулентность Δpgm штаммов *Y. pestis*

Ранее проведенные исследования показали, что аттенуированные Δpgm штаммы *Y. pestis* и *Y. pseudotuberculosis*, не обладающие способностью получать железо из биологических жидкостей, восстанавливают вирулентность для мышей и морских свинок при парентеральном введении перед заражением гемина или неорганического железа. Для создания воспроизводимой модели бубонной чумы исследовали изменение остаточной вирулентности Δpgm штамма *Y. pestis* EV НИИЭГ для мышей при совместном введении с декстраном железа. Развитие заболевания и выживаемость животных учитывали при подкожном введении штамма *Y. pestis* EV НИИЭГ и однократной и ежедневных инъекциях декстрана Fe(OH)₃. Мыши

контрольных групп получили или только штамм чумного микроба, или только препарат железа (рисунок 12).

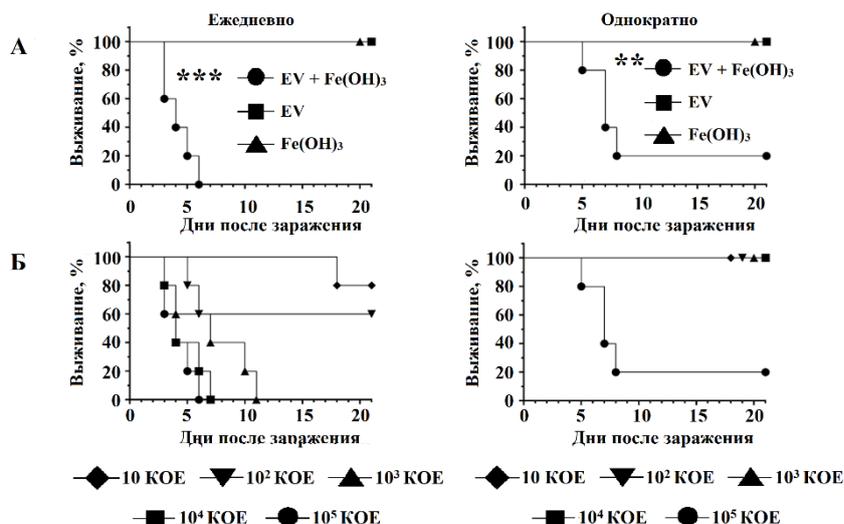


Рисунок 12 – Выживаемость беспородных мышей после подкожного введения штамма *Y. pestis* EV НИИЭГ при добавлении железа

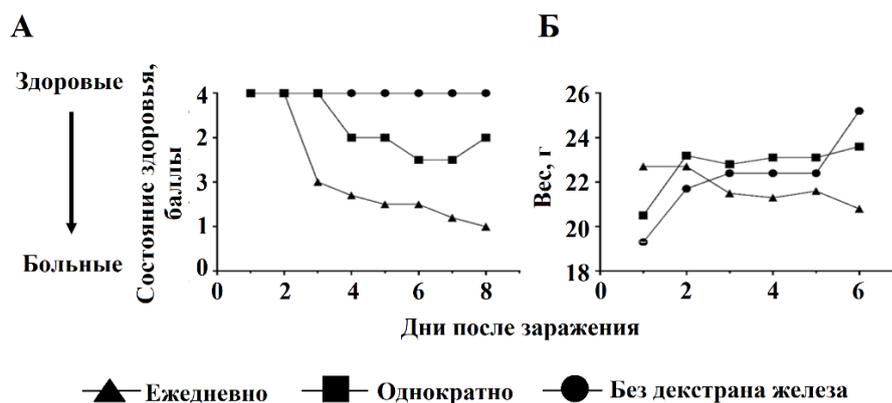
Животные контрольных групп, получившие только препарат железа или только штамм *Y. pestis* EV НИИЭГ, оставались здоровыми. ЛД₅₀ штамма *Y. pestis* EV НИИЭГ при ежедневном введении беспородным мышам декстрана Fe(OH)₃ достоверно превышала аналогичный показатель при однократном введении препарата ($p = 0,0086$). Различия в выживаемости животных в группах как с однократным ($p = 0,003$), так и с ежедневным ($p = 0,0001$) введением железа по сравнению с контролем были достоверны (таблица 3).

Таблица 3 – Влияние декстрана железа на остаточную вирулентность штамма *Y. pestis* EV НИИЭГ для беспородных мышей

| Штамм | Декстран железа, 40 мг | ЛД ₅₀ , КОЕ* | Доза, КОЕ | Средние сроки жизни, сутки |
|---------------------------|------------------------|---------------------------|----------------------|----------------------------|
| <i>Y. pestis</i> EV НИИЭГ | однократно | 50119 (19953 ÷ 794328) | 10 – 10 ⁴ | > 21 |
| | | | 10 ⁵ | 5,4 ± 1,3 |
| | ежедневно | 79 (20 ÷ 316) | 10 | 18 |
| | | | 10 ² | 5,5 ± 0,7 |
| | | | 10 ³ | 7 ± 3,5 |
| | | | 10 ⁴ | 4,8 ± 1,6 |
| 10 ⁵ | 4,2 ± 1,3 | | | |
| <i>Y. pestis</i> 231 | – | 3 (1-12) | 10 – 10 ⁴ | 5,4 ± 0,5 |

Для установления особенностей заболевания состояние здоровья и массу тела беспородных мышей из всех экспериментальных групп контролировали в течение всего эксперимента ежедневно. У животных, получивших штамм *Y. pestis* EV НИИЭГ с добавлением декстрана железа, заболевание прогрессировало (снижение веса и активности, обезвоживание и взъерошенность шерсти), пока мыши не пали, в то время как контрольные мыши оставались здоровыми. У павших беспородных мышей

наблюдали патологоанатомические изменения, характерные для бубонной чумы (рисунок 13).



А – показатель здоровья; Б – вес

Рисунок 13 – Оценка физического здоровья мышей после введения штамма *Y. pestis* EV НИИЭГ в присутствии железа

Кроме того, изучили диссеминацию штамма *Y. pestis* EV НИИЭГ при ежедневном и однократном введении препарата железа. В первые дни после введения наряду с однократной инъекцией железа большая часть бактерий находилась в регионарных лимфоузлах с последующим распространением в селезенку, в которой со временем количество бактерий уменьшалось. При ежедневном введении декстрана $Fe(OH)_3$ наблюдали сохранение высокого уровня бактериальной колонизации регионарных лимфоузлов и селезенки мышей (рисунок 14).

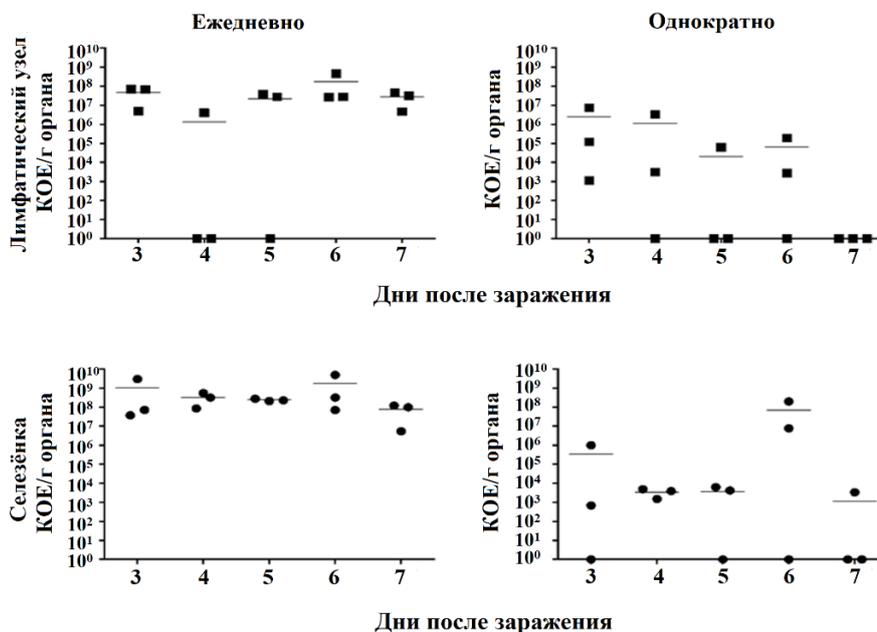


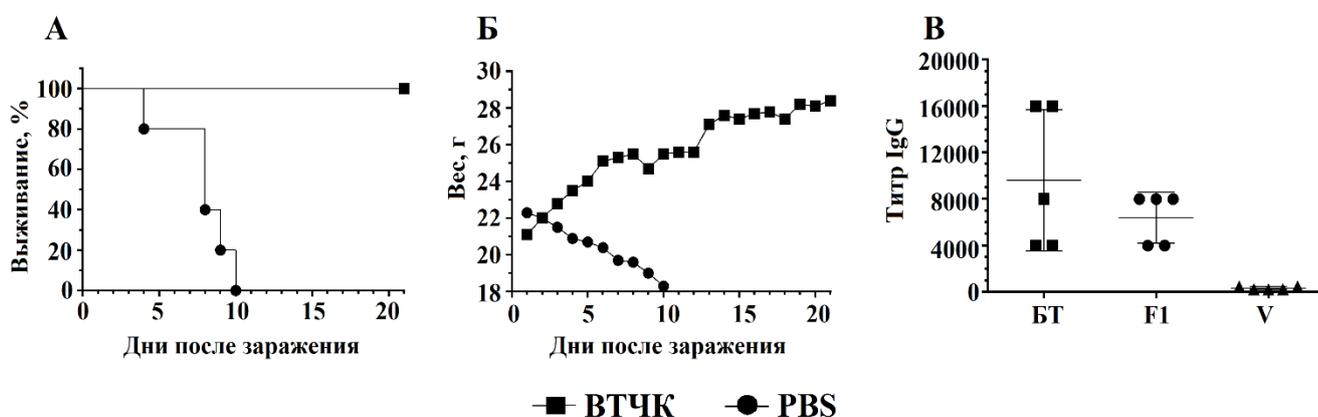
Рисунок 14 – Бактериальная колонизация внутренних органов беспородных мышей, после введения штамма *Y. pestis* EV НИИЭГ в присутствии железа

Модель бубонной чумы у беспородных мышей в условиях УББ 2 лаборатории после введения штамма *Y. pestis* EV НИИЭГ и декстрана железа для изучения протективности кандидатных вакцинных препаратов

На следующем этапе определили применимость данной модели для исследования протективности препарата бактериальных тений чумного микроба с рекомбинантными белками капсульным антигеном F1 (Caf1) и V антигеном (LcrV) (вакцина чумная трехкомпонентная). Беспородных мышей иммунизировали двукратно подкожно вакциной чумной трехкомпонентной или PBS в качестве отрицательного контроля. На 14 сут после бустерной иммунизации наблюдали образование специфических IgG антител к БТ, F1 и V антигенам со средними титрами 9600, 6400 и 350, соответственно (рисунок 15В). Двукратное подкожное введение ВЧТК не приводило к появлению у животных видимых негативных реакций: не влияло на поведение животных, не вызывало изменений шерстяного покрова, слизистых глаз и носа; снижения темпа набора веса (рисунок 15Б) и не приводило к повышению температуры тела.

На 14 сут после повторной иммунизации мышам ввели подкожно 10^5 КОЕ штамма *Y. pestis* EV НИИЭГ и ежедневно внутрибрюшинно по 4,0 мг декстрана железа на протяжении 5 сут. Все мыши контрольной группы, иммунизированные только PBS, пали на 4-10 сут после заражения. Как и ожидалось, иммунизация ВЧТК обеспечила 100 % защиту животных от гибели после заражения (рисунок 15А).

Полученные результаты подтверждают, что при условии введения декстрана железа вакцинный штамм EV НИИЭГ можно использовать для изучения протективности вакцинных препаратов против чумы (рисунок 15).



Выживание (А) и вес животных (Б) наблюдали на протяжении 21 сут. Титры IgG против антигенов F1, V, а также бактериальных тений *Y. pestis* (В) определяли методом ИФА в сыворотках животных на 14 сут после бустерной иммунизации.

Рисунок 15 – Заражение ВЧТК-иммунизированных беспородных мышей

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящее время ВОЗ не рекомендует иммунизацию чумными вакцинами старого поколения. Рост числа вспышек чумы, проблемы биологической защиты населения и доступность новых технологий разработки вакцин вызвали возобновление интереса к созданию чумных вакцин нового поколения. В 2018 г. в ВОЗ было зарегистрировано 17 кандидатных чумных вакцин, разрабатываемых частными и

государственными лабораториями. На сегодняшний день их количество увеличилось до 21. В 2018 г. ВОЗ предоставила разработчикам рекомендации о желательных характеристиках современных иммунопрофилактических противочумных препаратов, так называемый «Профиль целевого продукта», отражающий ожидания регулирующих органов, технологическую осуществимость, а также рассматривающий как плановый, так и экстренный сценарий использования вакцины.

Исход бактериальных инфекций и иммунный ответ на бактериальные вакцины сильно различаются у разных видов животных и даже у разных внутривидовых групп. Поэтому выводы, сделанные на модели лабораторных животных нужно с осторожностью транслировать на человека. По крайней мере, частично успешное решение проблемы низкой трансляционности доклинических исследований достигается путем замены недавно очень популярных инбредов одного вида млекопитающих аутбредными биомоделями двух или трех видов, или тщательно отобранными панелями из нескольких инбредов. Оба этих подхода направлены на воспроизведение разнообразия иммунных ответов, обнаруженных в естественных популяциях животных и людей. Однако этот подход только дает представление о том, какая часть иммунизированных остается незащищенной, но никоим образом не защитит серонегативных животных и/или непрореагировавших на иммунизацию стимуляцией клеточного звена иммунитета. Для обеспечения защиты этой части иммунизированных необходимо ввести в состав вакцины консервативные протективные антигены, характеризующиеся минимальным полиморфизмом молекулярной структуры и эпитопов, а также однородностью протективного иммунного ответа у разных генотипов иммунизированных индивидуумов.

На рубеже веков австрийские ученые разработали технологию бактериальных теней, воспроизведенную на широком круге бактерий и оптимально сочетающую безвредность со способностью индуцировать сбалансированный клеточный и гуморальный иммунитет. Подобные исследования на модели *Y. pestis* не проводились, и заявка нашего научного коллектива была поддержана грантом РФФИ 19-15-00072 на 2019-2021 гг.

Для выявления антигенов, способных расширить спектр эффективно иммунизируемых генотипов и даже видов животных, мы сконструировали набор плазмид, обеспечивающих образование «бактериальных теней» с различной степенью деструкции клеточной стенки бактерий. Для этого, помимо гена белка E бактериофага φX174 и генов лизиса фага λ, использовали гены холина и эндолизина чумного диагностического бактериофага Л-413С в различных комбинациях.

Выбранный нами подход к конструированию БТ оказался верным и, судя по данным ПЭМ, позволил сформировать практически полный спектр структурных вариантов БТ, определяемых степенью деградации пептидогликанового скелета. Сравнение ПЭМ-фотографий поверхности клеток *Y. pestis* после индукции лизиса показало, что БТ, несущие ген E или гены S, R и Rz, демонстрируют заметные поверхностные складки (потерю округлости) из-за потери цитоплазматического содержимого, хотя и сохраняют основную морфологию родительских бактериальных клеток. Практически сохранившие форму исходных бактериальных клеток наружные мембраны с небольшими изменениями морфологии указывают на локальный гидролиз пептидогликана в месте образования трансмембранного тоннеля. Мутация же *Sam7* генов лизиса фага λ затрудняет переход эндолизина из цитоплазмы в периплазму и, соответственно, гидролиз пептидогликана. Морфология БТ *Y. pestis* заметно отличалась от таковой у *E. coli*. Микрофотографии клеток *Y. pestis*, продуцирующих

холин и эндолизин фага Л-413С, показывают, что бактериальные клетки полностью теряют свою трехмерную форму, напоминая не «бактериальных призраков», а скорее смятые «тканевые» мешочки.

Существует определенное разнообразие врожденного и адаптивного противоинфекционного иммунитета среди людей и лабораторных животных. Эти различия, включая специфические для каждого вида различия в эффекторных механизмах, опосредованных IFN- γ и IL-1 β , все еще мало изучены. Нам также не удалось сделать глобальных открытий в этом разделе нашего исследования. Чтобы закрыть эти пробелы в наших знаниях, необходимо провести дополнительные исследования с использованием гуманизированных моделей животных.

Основная цель нашего исследования состояла в определении присутствия в препаратах БТ компонентов, которые защищают морских свинок (а, возможно, и человека), и изучении зависимости силы иммунного ответа от степени деградации клеточной стенки БТ. Одна из основных целей внедрения технологии бактериальных теней – создание структур с минимально измененной бактериальной поверхностью. Ожидалось, что лучше сохраненные компоненты клеточной стенки будут вызывать лучшую защиту. Однако в наших исследованиях значительное усиление защиты было отмечено при использовании вариантов БТ с полностью разрушенным пептидогликановым скелетом. По сравнению с отрицательным контролем иммунизация Е-У-К-БТ защищала морских свинок от 333 ЛД₅₀ штамма *Y. pestis* дикого типа.

Пептидогликан обладает как иммунодепрессивными, так и иммуностимулирующими свойствами. Гидролиз пептидогликана приводит к образованию множества молекул мурамил-дипептида (N-ацетилмурамил-L-аланил-D-изоглутамин), наименьших компонентов муреина, обладающих адьювантной активностью, достаточной для замены целых убитых микобактериальных клеток в полном адьюванте Фрейнда и, соответственно, повышения иммунного ответа. Таким образом, препарат ЕУК-БТ с полностью гидролизированным пептидогликаном вызывал значительно большую защиту от гибели при заражении *Y. pestis* у морских свинок по сравнению с классическими БТ и может использоваться в качестве эффективного компонента для разработки безопасной вакцины против чумы для нескольких хозяев (мышь, морская свинка, кошка, собака, овца, верблюд, человек, и другие млекопитающие). Независимо от того, верна ли наша гипотеза о пептидогликан-зависимом механизме увеличения защитной активности у морских свинок, нам удалось создать кандидатную чумную вакцину, которая индуцирует интенсивный иммунитет у морских свинок (индекс иммунитета = 49000), сопоставимый с таковым в ответ на иммунизацию живой чумной вакциной (индекс иммунитета = 9400000). Полученные данные ясно показывают, что отбор защитных антигенов для вакцин должен проводиться с самого начала с использованием как можно большего числа видов животных, которых эта вакцина должна защищать.

Сконструированные в настоящем исследовании литические плазмиды и методические приемы получения бактериальных теней *Y. pestis* в настоящее время применяются при разработке средств специфической профилактики чумы в рамках деятельности Центра геномных исследований мирового уровня «Центр геномных исследований мирового уровня по обеспечению биологической безопасности и технологической независимости в рамках Федеральной научно-технической программы развития генетических технологий» (Соглашение № 075-15-2019-1671 от 31.10.2019 г.), а также при создании платформ для быстрой разработки бактериальных вакцин в рамках

Федерального проекта «Санитарный щит страны – безопасность для здоровья (предупреждение, выявление, реагирование)».

Одним из основных итогов методической части работы является создание набора плазмид, позволяющих проводить направленное конструирование штаммов энтеробактерий, продуцирующих БТ с различной степенью деградации пептидогликана – потенциальные компоненты кандидатных вакцинных препаратов. Что же касается окончательного решения вопроса о том, какая технология конструирования вакцин является оптимальной для профилактики чумы: рекомбинантные белки в составе субъединичных препаратов, препараты на основе нуклеиновых кислот, живые аттенуированные вакцины, везикулы наружной мембраны или БТ, то для решения необходимо провести большой объем дополнительных сравнительных исследований, включающий не только подкожное, но и аэрозольное заражение расширенного перечня иммунизированных лабораторных животных несколькими вирулентными штаммами, отличающимися по антигенному составу.

ВЫВОДЫ

1. Сконструирован набор плазмид с различными комбинациями гена белка Е фага φX174 и каскет литических генов систем «холин-эндолизин» фагов λ или чумного диагностического фага Л-413С для получения теней энтеробактерий с различной степенью деструкции клеточной стенки.

2. Экспериментально доказано, что использование холина и эндолизина чумного диагностического бактериофага фага Л-413С в отдельности или в сочетании с белком Е бактериофага φX174 приводит к максимальной деструкции пептидогликанового каркаса клеточной стенки кишечной палочки и чумного микроба.

3. Определено, что двукратная подкожная иммунизация препаратом Е-У-К-БТ индуцирует напряженный иммунный ответ и защищает от гибели морских свинок при заражении вирулентным штаммом *Y. pestis* дикого типа (индекс иммунитета (ИИ) = $4,9 \times 10^4$), но не протективна для беспородных мышей (ИИ = 3×10^0).

4. Установлено, что двукратное с интервалом в две недели подкожное введение беспородным мышам и морским свинкам композиции ЕУК-БТ с иммунодоминантными антигенами чумного микроба – капсульным антигеном F1 (Caf1) и V антигеном (LcrV), вело к индукции синтеза специфических анти-F1 и анти-V антител, а также антител к компонентам клеточной стенки бактериальных теней чумного микроба, формированию напряженного иммунного ответа и защищало животных от гибели при подкожном заражении вирулентным штаммом *Y. pestis* дикого типа (ИИ > 10^5 для морских свинок и ИИ > 10^4 для мышей).

5. Показано, что аттенуированные Δpgm штаммы *Y. pestis* в присутствии коллоидного железа могут быть использованы в условиях лаборатории УББ 2 для моделирования бубонной чумы с выраженными патологоанатомическими изменениями и летальностью у мышей, а также оценки напряженности иммунного ответа.

РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ИСПОЛЬЗОВАНИЮ РЕЗУЛЬТАТОВ ДИССЕРТАЦИОННОГО ИССЛЕДОВАНИЯ

1. Созданный набор плазмид с различными комбинациями гена белка Е фага φX174 и кассетами литических генов систем «холин-эндолизин» фагов λ или Л-413С, обеспечивающих различную степень деструкции клеточной стенки, целесообразно использовать для образования теней энтеробактерий.

2. Бактериальные тени чумного микроба рекомендуем включать в состав субъединичного вакцинного препарата для профилактики чумы.

3. Атенуированные *ΔprgM* штаммы *Y. pestis* в присутствии коллоидного железа могут в условиях лаборатории УББ 2 заменить штаммы «дикого» типа для моделирования бубонной чумы с выраженными патологоанатомическими изменениями и летальностью у мышей.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

а) статьи в рецензируемых журналах:

1. **Вагайская, А.С.** Моделирование экспериментальной чумы в условиях лаборатории уровня биобезопасности 2 / **А.С. Вагайская**, А.С. Трунякова, Т.И. Комбарова, С.В. Дентовская // Проблемы особо опасных инфекций. – 2021. – № 4. – С. 46–53. **Scopus K2**;

2. Dentovskaya, S.V. Peptidoglycan-free bacterial ghosts confer enhanced protection against *Yersinia pestis* infection / S.V. Dentovskaya, **A.S. Vagaiskaya**, M.E. Platonov, A.S. Trunyakova, S.A. Kotov, E.A. Krasil'nikova, G.M. Titareva, E.M. Mazurina, T.V. Gapel'chenkova, R.Z. Shaikhutdinova, S.A. Ivanov, T.I. Kombarova, V.N. Gerasimov, V.N. Uversky, A.P. Anisimov // Vaccines. – 2021. – Vol. 10. – No. 1. – P. 51. DOI: 10.3390/vaccines10010051. **WoS Q1**;

3. Дентовская, С.В. К вопросу о критериях перевода аттенуированных штаммов *Yersinia pestis* из I в III группу патогенности (опасности) / С.В. Дентовская, А.С. Трунякова, **А.С. Вагайская**, М.Е. Платонов, Е.А. Тюрин, А.П. Анисимов // Проблемы особо опасных инфекций. – 2022 г. - № 2. – С. 20-26. **Scopus K2**;

4. Платонов, М.Е. Эффективность фаговых литических ферментов при получении бактериальных теней / М.Е. Платонов, **А.С. Вагайская**, А.С. Трунякова, Д.В. Гриненко, В.Н. Герасимов, С.В. Дентовская, А.П. Анисимов // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. – 2022. – Т 40. – № 3. – С. 26-31 **WoS Q4**;

5. Вагайская, А.С. Бактериальные тени возбудителей особо опасных инфекций / А.С. Вагайская, С.В. Дентовская, А.П. Анисимов // Проблемы особо опасных инфекций. – 2023. – № 1. – С. 17-26. DOI: 10.21055/0370-1069-2023-1-17-26. **Scopus K2**;

б) тезисы научных конференций

6. Дентовская, С.В. Протективная активность «бактериальных теней» *Yersinia pestis* / С.В. Дентовская, М.Е. Платонов, **А.С. Вагайская**, А.С. Трунякова, С.А. Иванов, А.П. Анисимов // Материалы XIII Ежегодного Всероссийского Конгресса по инфекционным болезням имени академика В.И. Покровского «Инфекционные болезни в современном мире: эволюция, текущие и будущие угрозы» IV Всероссийской научно-практической конференции «Актуальные проблемы болезней, общих для человека и животных» VI Всероссийского симпозиума «Папилломавирусная инфекция и рак: эпидемиология, диагностика, вакцинопрофилактика». 2021. С. 184.

7. Anisimov, A.P. *Yersinia pestis* bacterial ghosts / A.P. Anisimov, M.E. Platonov, **A.S. Vagaiskaya**, T.V. Gapel'chenkova, S.A. Ivanov, R.Z. Shaikhutdinova, A.S. Trunyakova, V.N. Gerasimov, S.V. Dentovskaya // Abstract book of the 24th International Scientific Conference “Current issues on zoonotic diseases” dedicated to the 90th anniversary of the National Center for Zoonotic Diseases. Editor-in-chief: N. Tsogbadrakh. NCZD Ulaanbaatar. 2021. P. 15.

8. **Вагайская, А.С.** Оценка протективности бактериальных теней *Yersinia pestis* с различной степенью деградации пептидогликана / **А.С. Вагайская**, М.Е.

Платонов, А.С. Трунякова, С.А. Иванов, Р.З. Шайхутдинова, С.В. Дентовская, А.П. Анисимов // Современные проблемы эпидемиологии, микробиологии и гигиены Материалы XIV Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых и специалистов Роспотребнадзора. Москва, 2022. С. 46-49.

9. **Vagaiskaya, A.S.**, Evaluation of Protective Efficacy of a Novel Inactivated *Yersinia pestis* Ghost Vaccine Against Virulent Challenge in Mice and Guinea Pigs / **A.S. Vagaiskaya**, М.Е. Platonov, А.Р. Anisimov // Материалы Международного симпозиума “Yersinia 14” 26–28 сентября 2022 г. Санкт-Петербург, Российская Федерация. 2022. С. 78.

10. Анисимов А.П. Прототип модульной вакцины на основе бактериальных теней *Yersinia pestis* / А.П. Анисимов, **А.С. Вагайская**, Р.Х. Жумакаев, С.В. Дентовская // Материалы VII Национального конгресса бактериологов опубликованы в журнале «Бактериология». – 2022. – Т. 7. – № 4. – С. 90.

11. **Вагайская А.С.** Прототип полигостальной трехкомпонентной вакцины для профилактики чумы / **А.С. Вагайская**, А.С. Трунякова, Е.А. Красильникова, Е.М. Мазурина, П.Х. Копылов, С.В. Дентовская, А.П. Анисимов // Материалы VIII Национального конгресса бактериологов 27-28 сентября 2023 г. Москва, Российская Федерация, 2023. С. 25.

12. Дентовская С.В. Обоснование выбора штамма чумного микроба для получения бактериальных теней / С.В. Дентовская, **А.С. Вагайская**, А.С. Трунякова, Е.А. Красильникова, Е.М. Мазурина, А.П. Анисимов // Материалы VIII Национального конгресса бактериологов 27-28 сентября 2023 г. Москва, Российская Федерация, 2023. С. 41.

13. Трунякова А.С. Использование модели бубонной чумы при тестировании кандидатных вакцинных препаратов в УББ 2 лаборатории / А.С. Трунякова, **А.С. Вагайская**, Е.М. Мазурина, С.В. Дентовская, А.П. Анисимов // Материалы VIII Национального конгресса бактериологов 27-28 сентября 2023 г. Москва, Российская Федерация, 2023. С. 134.

ПЕРЕЧЕНЬ СОКРАЩЕНИЙ, УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ, СИМВОЛОВ, ЕДИНИЦ И ТЕРМИНОВ

| | |
|----------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| БТ | – <u>б</u> актериальные <u>т</u> ени |
| ВОЗ | – <u>В</u> семирная <u>о</u> рганизация <u>з</u> доровья |
| <i>E</i> | – ген белка <i>E</i> бактериофага фХ174 |
| Е-БТ | – препарат БТ, полученный путем лизиса, опосредованного белком <i>E</i> бактериофага фХ174 |
| УК-БТ | – препарат БТ, полученный путем лизиса, опосредованного холином (У) и эндолизином (К) бактериофага Л-413 |
| ЕУК-БТ | – препарат БТ, полученный путем лизиса, опосредованного белком <i>E</i> бактериофага фХ174, а также холином (У) и эндолизином (К) бактериофага Л-413 |
| SRRz- БТ | – препарат БТ, полученный путем лизиса, опосредованного холином (Sam7), эндолизином (R) и спанинами (Rz и Rz1) бактериофага λ (cI857Sam7) |
| ESRRz-БТ | – препарат БТ, полученный путем лизиса, опосредованного белком <i>E</i> бактериофага фХ174, а также холином (У) и эндолизином (К) бактериофага Л-413 |
| ВЧТК | – <u>в</u> акцина <u>ч</u> умная <u>т</u> рех <u>к</u> омпонентная |

| | |
|------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------|
| ГКПМ | – <u>Г</u> осударственная <u>к</u> оллекция <u>п</u> атогенных <u>м</u> икроорганизмов |
| ДНК | – <u>д</u> езоксирибонуклеиновая <u>к</u> ислота |
| ИИ | – <u>и</u> ндекс <u>и</u> ммунитета |
| ИФА | – <u>и</u> ммуноферментный <u>а</u> нализ |
| КОЕ | – <u>к</u> олониеобразующая <u>е</u> диница |
| ЛД ₅₀ | — доза, летальная для 50 % животных |
| НИИЭГ | – <u>н</u> аучно-исследовательский <u>и</u> нститут <u>э</u> пидемиологии и <u>г</u> игиены |
| ОП | – <u>о</u> птическая <u>п</u> лотность |
| ОСА | – <u>о</u> сновной <u>с</u> оматический <u>а</u> нтиген |
| ПЭМ | – <u>п</u> росвечивающая <u>э</u> лектронная <u>м</u> икроскопия |
| РНК | – <u>р</u> ибонуклеиновая <u>к</u> ислота |
| УББ | – <u>у</u> ровень <u>б</u> иологической <u>б</u> езопасности |
| ФБУН | – <u>Ф</u> едеральное <u>б</u> юджетное <u>у</u> чреждение <u>н</u> ауки |
| ВНИ | – <u>b</u> rain <u>h</u> eart <u>i</u> nfusion |
| Caf1 (F1) | –капсульный антиген чумного микроба (<u>c</u> apsular <u>a</u> ntigen <u>f</u> raction <u>1</u>) |
| <i>cat</i> | – ген, кодирующий хлорамфениколацетилтрансферазу |
| IFN-1 | – IFN-1 – interferon type I – интерферон типа I |
| IL | – interleukin – интерлейкин |
| <i>K</i> | – ген эндолизина бактериофага Л-413С |
| LB | – Luria Bertani broth medium |
| LcrV | – V антиген чумного микроба |
| <i>lpxM</i> | – ген лаурилтрансферазы |
| PBS | – фосфатный буферный раствор (<u>P</u> hosphate <u>b</u> uffered <u>s</u> aline) |
| <i>pgm</i> | – локус пигментсорбции |
| <i>R</i> | – ген эндолизина бактериофага λ |
| <i>Rz</i> | – ген спанина бактериофага λ |
| <i>S</i> | – ген холина бактериофага λ |
| <i>Y</i> | – ген холина бактериофага Л-413С |
| Ymt | – <u>y</u> ersinia <u>m</u> ouse <u>t</u> oxin – мышинный токсин |