

УДК 578.233.2

ЗНАЧИМОСТЬ АНТИГЕНОВ *Yersinia pestis* В РЕЦЕПЦИИ ЧУМНОГО ДИАГНОСТИЧЕСКОГО БАКТЕРИОФАГА L-413C

© 2024 г. А. А. Бывалов^{1, 2, *}, Л. Г. Дудина^{1, 2}, Т. Б. Кравченко³, С. А. Иванов³,
И. В. Конышев^{1, 2}, Н. А. Морозова¹, А. В. Чернядьев¹, С. В. Дентовская^{3, **}

¹Вятский государственный университет, Киров, 610000 Россия

²Институт физиологии Коми научного центра Федерального исследовательского центра “Коми научный центр Уральского отделения Российской академии наук”, Сыктывкар, 167982 Россия

³Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии Роспотребнадзора, Серпухов, 142279 Россия

*e-mail: byvalov@nextmail.ru

**e-mail: info@obolensk.org

Поступила в редакцию 10.01.2024 г.

После доработки 25.01.2024 г.

Принята к публикации 28.02.2024 г.

Проведена экспериментальная оценка роли поверхностных антигенов *Yersinia pestis* в рецепции бактериофага L-413C. С помощью методов, основанных на определении уровня инактивации фага после коинкубации с находящимися в растворе или сорбированными на полистирольных микросферах антигенами, подтверждена значимость липополисахарида чумного микроба в связывании частиц фага и отсутствие связывающей способности у капсульного антигена F1, белка Ail и двух автотранспортных белков YарF и YарM. Препараты нативного и рекомбинантного антигена PsaA в растворе, но не в связанном с микросферами виде, существенно и в одинаковой мере подавляли литическую активность фага. Адгезивность бактерий родительского штамма EV в отношении фага L-413C не превышала адгезивность клеток нокаутного мутанта EVΔpsaA. Использование трех методов оценки роли антигена PsaA в рецепции фага L-413C дали противоречивые результаты. С одной стороны, реакционноспособные домены PsaA взаимодействуют с частицами фага в растворе. В то же время эти домены, по-видимому, определяют неспецифическое связывание белка PsaA с нижерасположенными структурами бактериальной клетки и материалом микросферы, препятствуя адгезии фага.

Ключевые слова: бактериофаг L-413C, антиген, *Yersinia pestis*, рецептор

DOI: 10.31857/S0555109924040094 EDN: SAFZEF

В последние десятилетия одной из глобальных проблем медицины стал резкий рост антибиотикорезистентности возбудителей бактериальных инфекций, в том числе и чумного микроба. От больных людей и животных выделяют культуры *Yersinia pestis*, устойчивые к действию антибиотиков, рекомендованных для лечения чумы [1, 2].

Показано, что гены резистентности как к отдельным [3, 4], так и одновременно к нескольким антибиотикам [5], предположительно могут переноситься в клетки *Y. pestis* конъюгативными плазмидами энтеробактерий кишечника блох – естественного переносчика возбудителя [6]. Проблема борьбы с антибиотикорезистентностью может решаться несколькими путями: разработкой новых классов антибиотиков, а также иных терапевтических средств, а именно иммунотерапевтических препаратов, катионных

пептидов – ингибиторов отдельных факторов вирулентности, в частности, белков системы секреции III типа и связанных с ними токсинов, а также препаратов, действующих на структуры макроорганизма, используемые возбудителем для инвазии (host-directed therapies). Иными подходами к решению этой проблемы являются коррективка питания макроорганизма (nutritional immunity), применение бактерий-хищников (predatory bacteria), выживание которых зависит от использования клеток возбудителя в качестве источника питания, а также поиск ингибиторов LpxC – фермента, катализирующего первую обязательную стадию биосинтеза липида A [6].

Еще одним подходом к созданию альтернативных средств лечения чумы является фаготерапия, которая может быть использована в том числе и на фоне применения антибиотиков [7, 8].

Первая попытка лечения больных чумой путем введения суспензии литического фага в бубоны, предпринятая столетие назад, оказалась удачной [9]. Однако в последующем в силу разных причин, главным образом вследствие появления эффективных антибиотиков, это направление утратило актуальность. Рост числа случаев выделения антибиотикорезистентных культур *Y. pestis* от больных людей и животных сделал актуальным возобновление исследований в области создания средств фаготерапии чумы [10]. Для повышения вероятности эффективного лечения чумы, вызванной существенно различающимися штаммами возбудителя, считается целесообразным составление “коктейлей”, включающих несколько фагов, способных лизировать максимальное количество штаммов *Y. pestis* [11].

Чумные бактериофаги различаются по генетической организации, определяющей особенности их морфологии, антигенности, вирулентности в отношении культур *Y. pestis* и структуры выявляемого ими рецепторного аппарата бактерий. Геномы наиболее часто используемых чумных фагов L-413С, фА1122, Покровской и Yер-phi секвенированы [11]. Эти фаги характеризуются различной и относительной специфичностью, они позволяют выявлять наряду со штаммами чумного микроба некоторые штаммы *Yersinia pseudotuberculosis* или *Escherichia coli*. По-видимому, один из наиболее высокоспецифичных фагов – литический фаг L-413С морфотипа *Myoviridae*, относимый к Р2-подобным фагам, превосходит по диагностической специфичности фаги Покровской и фА1122 морфотипа *Podoviridae*. Вместе с тем, предположительно ложноотрицательные (равно как и ложноположительные) результаты, полученные при использовании одного фага, например, L-413С целесообразно подтверждать или отрицать применением другого фага, взаимодействующего с иным рецептором на поверхности чумного микроба, например, фага Покровской [11, 12]. При этом нужно учитывать значимость температуры культивирования идентифицируемых клеток иерсиний. Так, рецептор-связывающий белок GpH фага L-413С способен выявлять культуры чумного микроба, выращенные при различных температурах (от 6 до 37°C), в то время как аналогичный белок Gp17 фага фА1122 может связываться с клетками *Y. pseudotuberculosis*, выращенными при температуре 37°C или, во всяком случае, не ниже 30°C. Бактерии *Y. pestis*, выращенные при температуре 37°C, практически не выявляются с помощью белка Gp17 из-за экранирования рецепторов капсульным антигеном [13]. Кроме того, при оценке эффективности фагов следует отдавать отчет в том, что они могут характеризоваться различной литической активностью в условиях *in vitro* и *in vivo*. Так, фаг PST проявлял

выраженную литическую активность в отношении бактерий штамма *Y. pestis* EV76, выращенных как в жидкой питательной среде, так и в цельной крови человека, в то время как фаг фА1122 активно лизировал лишь микробные клетки после их культивирования в жидкой питательной среде [10]. В такого рода исследованиях следует использовать в том числе и условия, имитирующие ту или иную среду обитания возбудителя в организме хозяина. Это особенно важно для возбудителя чумы, способного расти и размножаться внутриклеточно и в биологических жидкостях человека.

Вполне вероятно, что одним из компонентов разрабатываемого “коктейля” должен стать фаг L-413С, как способный лизировать наибольшее количество штаммов возбудителя чумы (99.9%) и, по-видимому, на сегодняшний день наиболее специфичный из числа используемых в диагностической практике чумных фагов [12]. Очевидно, эти достоинства фага L-413С определяются его существенными отличиями от большинства других чумных фагов, используемых в диагностической практике, не только по морфологическим особенностям, но и по механизмам рецепции и последующим стадиям инфицирования бактериальной клетки. Однако, несмотря на доказанную значимость липополисахарида (ЛПС) *Y. pestis* в качестве рецептора фага L-413С, процесс первичной адгезии фага на поверхности микробной клетки нуждается в дальнейшем исследовании.

Цель работы – изучение значимости поверхностных антигенов *Y. pestis* в рецепции фага L-413С.

МЕТОДИКА

Бактериофаги. В работе использовали бактериофаги производства ФКУН Российский научно-исследовательский противочумный институт “Микроб”: 1) чумной L-413С морфотипа *Myoviridae*, по новой классификации (<https://ictv.global/taxonomy>) – Peduovirus L413С (класс Caudoviricete, семейство Peduoviridae, род *Peduovirus*) и 2) псевдотуберкулезный диагностический морфотипа *Podoviridae*, по новой классификации (<https://ictv.global/taxonomy>) – Teseptimavirus YpsP-G (класс Caudoviricete, семейство Autographiviridae, субсемейство *Studiivirinae*, род *Teseptimavirus*), известный и как бактериофаг d’Herelle-m (PpsP-G) [11, 14].

Получение нокаутного мутанта Δ psaA. Конструирование нокаутного Δ psaA мутанта вакцинного штамма *Y. pestis* EV линии НИИЭГ проводили с помощью RedGam-мутагенеза по методу, описанному в работе [15].

Выделение и очистка антигенов. Выделение и очистку препаратов рекомбинантного (PsaA-рек) и нативного (PsaA-нат) антигена

PsaA (или впервые обозначенного как антиген рН 6) из штаммов *E. coli* DH5 α /pIG428 и *Y. pestis* KM260(11) соответственно, проводили как описано в работе [16]. Секретируемый капсульный антиген (F1, Caf1) выделяли из супернатанта культуры *Y. pseudotuberculosis* 11M/pFSK3–9 путем фракционирования сульфатом аммония с последующей хроматографической очисткой (Методические рекомендации 4.2.0219–20 “Выделение и очистка F1 антигена чумного микроба”).

Кодирующую последовательность генов *yapF*, *yapM* и *ail* из штамма *Y. pestis* subsp. *pestis* EV линии НИИЭГ клонировали в составе векторной плазмиды pET32b(+) по сайтам рестриктаз NdeI и XhoI в клетках дефицитного по протеазе штамма *E. coli* BL21(DE3) (“Novagen”, Германия). Рекомбинантные белки YapF, YapM и Ail выделяли методом металло-хелатной хроматографии. Препарат ЛПС выделяли из культуры вакцинного штамма *Y. pestis* subsp. *pestis* EV линии НИИЭГ, выращенной при 27°C, методом Вестфала с помощью водно-фенольной экстракции [17] и очищали трехкратным ультрацентрифугированием при 105000 g в течение 3 ч.

Получение антисывороток. Беспородных белых мышей обоего пола массой (19 \pm 1) г иммунизировали препаратами вышеназванных белковых антигенов подкожно двукратно с интервалом 30 сут. Через 30 сут после бустерной иммунизации забирали кровь путем пункции ретроорбитального синуса.

Твердофазный иммуноферментный анализ (ТИФА). Использовали стандартную процедуру постановки реакции. Лунки микротитровальных планшетов (“Greiner BioOne”, Германия) сенсibilизировали 100 мкл антигенных препаратов в концентрации 10 мкг/мл, после отмывки блокировали 250 мкл блокирующего буфера (1%-ного бычьего сывороточного альбумина, БСА, “Диаэм”, Россия). Далее в лунки добавляли 100 мкл комплементарной сенситину исследуемой антисыворотки, после отмывки вносили 100 мкл козьего антимышиного конъюгата (“Sigma”, США) в буфере для отмывки с 0.5% БСА и после инкубации (1 ч при комнатной температуре) четырежды отмывали. Вносили по 100 мкл субстрата (0.04%-ный ортофенилендиамин, “Alfa Aesar”, Великобритания) в 0.1 М цитратном буфере, рН 4.7–5.0, с добавлением 0.05% пероксида водорода и после 30 мин инкубации – 50 мкл 1 н H₂SO₄ для остановки реакции. Результаты реакции регистрировали с помощью микропланшетного ридера Anthos 2020 (ЗАО “БиоХимМак”, Россия) и выражали в единицах оптической плотности при $\lambda = 492$ нм (ОП₄₉₂).

Трансмиссионная электронная микроскопия. Исследуемые препараты наносили на медные сеточки (200 меш, SPISupplies, США), покрытые

углеродной пленкой-подложкой, сорбировали 2 мин, убирали избыток жидкости фильтровальной бумагой, сушили препарат. Снимки получали на электронном микроскопе JEM-2100 (“Jeol”, Япония) при ускоряющем напряжении 160 кВ. Фотографирование осуществляли с использованием CCD камеры Keen View (“Olympus”, Германия).

Сканирующая электронная микроскопия. Для измерения диаметра микросфер использованы сканирующий электронный микроскоп JEOL JSM-6510LV (JEOL, Япония) при ускоряющем напряжении 10 кВ, вакуумный напыляющий аппарат JEOL JFC-1600 (JEOL, Япония). Размер микросфер определяли при увеличении $\times 40000$ в ручном режиме с применением встроенного инструмента анализа размеров частиц.

Определение титра бактериофага. Использовали метод Грациа. Кратко: смесь (по 100 мкл) исследуемых растворов, содержавших бактериофаг и суспензию бактерий вакцинного штамма *Y. pestis* EV (~ 1 млрд м.к./мл), выращенного при 27°C в течение 18–20 ч, инкубировали 10 мин при комнатной температуре. Затем в пробирки добавляли по 3 мл 1.5% БТН-агара (“Биотехновация”, Россия), предварительно расплавленного и охлажденного до 47°C, интенсивно перемешивали и переносили в чашки Петри с подсушенным 3% БТН-агаром. Через 18–24 ч термостатирования чашек при 27°C подсчитывали количество бляшек, соответствующее числу бляшкообразующих единиц (БОЕ).

Сенсibilизация микросфер антигенами. Для сенсibilизации микросфер антигенами использовали полистирольные микросферы диаметром 1 мкм (Polysciences, США). Пассивную сенсibilизацию микросфер препаратами белков проводили в соответствии с ранее описанными методиками [18]. Процедура сенсibilизации микросфер препаратом ЛПС изложена в [19]. Контролем служили микросферы, покрытые БСА (“Диаэм”, Россия) по методике сенсibilизации микросфер белковыми антигенами *Y. pestis*. Конечные препараты сенсibilизированных микросфер в концентрации 0.5% (w/v) хранили при температуре 4–6°C в фосфатном буферном растворе, рН 7.3 (ФБР).

Наличие на поверхности сенсibilизированных микросфер того или иного белкового антигена, подтверждали иммунохимически. Для этого микросферы инкубировали с сывороткой, комплементарной целевому антигену, взятой в предварительно подобранной концентрации. По результатам сравнения результатов ТИФА сыворотки, истощенной микросферами той или иной специфичности, и сыворотки, коинкубированной с контрольными микросферами, покрытыми БСА, судили о присутствии антигена на поверхности микросфер. Как показали результаты

ТИФА, значения ОП₄₉₂ для сывороток, истощенных микросферами, которые были сенсibilизированы белковыми антигенами всех 6 типов, оказались не менее чем в два раза ниже по сравнению с соответствующими сыворотками, коинкубированными с микросферами “БСА”. Это однозначно указывало на наличие каждого из использованных антигенов на поверхности микросфер. Факт иммобилизации препарата ЛПС-EV на поверхности микросфер верифицировали методом сканирующей электронной микроскопии, оценивая их диаметр (диаметр несенсibilизированных микросфер составил 0.989 ± 0.009 мкм, покрытых ЛПС-EV – 0.994 ± 0.009 мкм, различие достоверно для $p < 0.01$).

Адсорбция бактериофага на сенсibilизированные микросферы. Сенсibilизированные тем или иным антигеном микросферы разводили ФБР до ОП₆₀₀, равной 1.2, на спектрофотометре SmartSpec Plus (“BioRad”, США). Затем смешивали 100 мкл суспензии тех или иных микросфер и 20 мкл разведенного в буфере SM (0.58% NaCl, 0.2% MgSO₄·7 H₂O, 0.05 М трис-HCl, pH 7.5) бактериофага с концентрацией $8 \cdot 10^5$ БОЕ/мл. Смесь инкубировали на термошейкере Thermo Shaker PST-60HL-4 (“Biosan”, Латвия) при 500 об/мин в течение 3 ч при температуре 37°C. После этого микросферы осаждали на центрифуге Centrifuge 5424 (“Eppendorf”, Германия) при 13000 г в течение 10 мин, надосадочные жидкости разбавляли 1 : 100 буфером SM и высевали на чашки Петри по методике определения титра бактериофага.

Инактивация бактериофага антигенами в растворе. Готовили препараты белковых антигенов, БСА и ЛПС-EV в концентрации 0.2 мг/мл в ФБР с 0.01% SDS. Предварительно белок Ail солюбилизировали в буфере TES (100 мМ Трис-HCl, pH 7.5, 1% ДДС-Na, 5 мМ ЭДТА) в объемном соотношении антиген – буфер 4 : 1 в течение 10 мин и диализовали против ФБР с 0.01% SDS, а препарат ЛПС-EV, хранившийся при температуре –70°C, центрифугировали (13000 г, 15 мин) для освобождения от высокомолекулярных конгломератов, надосадочную жидкость переводили в ФБР с 0.01% SDS. Смешивали 100 мкл каждого из этих растворов с 20 мкл бактериофага, разведенного буфером SM до концентрации $8 \cdot 10^5$ БОЕ/мл. Смесь инкубировали на термошейкере Thermo Shaker PST-60HL-4 (“Biosan”, Латвия) при 500 об/мин в течение 3 ч при температуре 37°C. По окончании инкубации суспензии разбавляли 1 : 100 в буфере SM и полученные разведения высевали по методике определения титра бактериофага.

Методика оценки адгезивности бактериофага к бактериальным клеткам. Культуры *Y. pestis* EV и EVΔ*psaA* выращивали в жидкой питательной среде LB (дрожжевой экстракт – 5 г/л, хлористый

натрий – 10 г/л, триптон – 10 г/л) при температуре 37°C и pH 6.0, а также pH 7.0 в течение 18–20 ч, осаждали низкоскоростным центрифугированием. Осадок клеток разводили до концентрации $8 \cdot 10^9$ кл./мл либо в ацетатном буферном растворе (АБР) (необработанные клетки), либо в АБР с добавлением 100 мМ периодата натрия. Обработку проводили в течение 2 ч при комнатной температуре в защищенном от света месте. Обработанные и необработанные клетки трижды отмывали буфером SM путем осаждения на центрифуге Eppendorf при 15870 г в течение 10 мин. Отмытые клетки разводили в жидкой питательной среде LB, доводя концентрацию до значения ОП₆₀₀ = 1.2. Далее к 100 мкл каждого препарата клеток добавляли 20 мкл препарата бактериофага L-413C в расчетной концентрации $8 \cdot 10^5$ БОЕ/мл и инкубировали при 27°C в течение 20 мин на шейкере-инкубаторе Thermo Shaker PST-60HL-4 (“Biosan”, Латвия) при 450 об./мин. Клетки осаждали на центрифуге Eppendorf при 15870 г в течение 10 мин и к 10 мкл надосадочной жидкости добавляли 990 мкл буфера SM, после чего полученные суспензии фага высевали по методу Грациа. Контролем служила суспензия фага без клеток в идентичной концентрации.

Иммунохимическую активность клеток *Y. pestis* EV и EVΔ*psaA* с полученной кроличьей антисывороткой к PsaA антигену оценивали методом ТИФА. Для этого в лунки планшета вносили суспензию клеток в концентрации $200 \cdot 10^6$ кл./мл и, после блокировки, последовательно по стандартной схеме добавляли антисыворотку к антигену PsaA, антикроличий пероксидазный конъюгат морской свинки (“Sigma”, США), ортофенилендиамин (“Alfa Aesar”, Великобритания), H₂SO₄. Результаты представляли в виде ОП₄₉₂.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Большинство чумных фагов в качестве рецепторов на поверхности клеток *Y. pestis* используют определенные участки липополисахарида [20]. Однако имеются сообщения об участии в процессе их адгезии и других компонентов наружной мембраны возбудителя. В этой связи, для дальнейшего изучения природы взаимодействия фага L-413C с клеткой чумного микроба оценивали значимость в рецепции фага ряда поверхностных антигенов *Y. pestis*, экспериментально подтвержденных или предположительно проявляющих адгезивные свойства по отношению к эукариотическим клеткам [21]. Как было показано ранее, антигены Ail и YarpF в той или иной степени могут участвовать в рецепции фагов Покровской и псевдотуберкулезного диагностического [22].

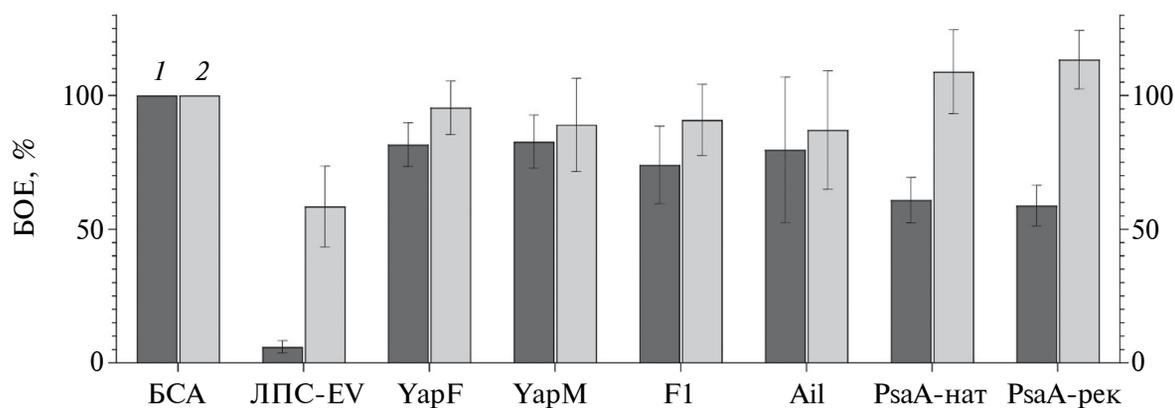


Рис. 1. Влияние на адсорбцию фага L-413C коинкубации с антигенами *Y. pestis*, находящимися в растворе (1) или на микросферах (2). БОЕ (%) – доля литически активных частиц фага после коинкубации с антигенами в растворе или на поверхности микросфер. За 100% принимали среднее значение концентрации фага после взаимодействия с БСА, иммобилизованным на микросферах, или в растворе; 95% CI – доверительный интервал для $p = 0.95$.

Возможный вклад антигенов *Y. pestis* в рецепцию фага L-413C первоначально оценивали с помощью двух методических подходов. Первый из них основан на способности микросфер, предварительно покрытых препаратом того или иного антигена, связывать частицы фага из раствора. Второй метод использует эффект инактивации литической способности фага за счет его связывания с водорастворимым антигеном, не связанным с твердой фазой. Полученные результаты, представленные на рис. 1, свидетельствуют о том, что антигены YopF, YopM, F1 и Ail не способны к существенному связыванию частиц фага, определяемому двумя использованными методами (различия не достоверны для $p = 0.01$). ЛПС проявил высокую адгезивность в отношении фага L-413C, причем выраженность этого эффекта более ярко проявлялась, когда антиген находился в растворе, по сравнению с антигеном, иммобилизованным на микросфере. При этом количество литически активных частиц фага, определенное двумя методами, снижалось до 6.0 ± 2.3 и $58.5 \pm 15.1\%$ относительно соответствующих контролей (рис. 1). Значимость ЛПС в качестве рецептора фага L-413C подтверждена и результатами трансмиссионной электронной микроскопии микросфер, покрытых ЛПС-EV и БСА (контроль). Доли микросфер “ЛПС-EV” и “БСА”, не содержащих на своей поверхности фаговых частиц, составили 23.0 и 41.7% соответственно. Среднее количество частиц фага, приходящихся на одну микросферу, оказалось равным, в среднем, 13.7 (для “ЛПС-EV”) и 1.6 (для “БСА”). Способность сенсibilизированных микросфер адгезировать частицы фага L-413C иллюстрирует рис. 2, на котором представлены покрытые препаратами ЛПС-EV и БСА микросферы,

инкубированные в суспензии фага L-413C. Как видно из рис. 2, частицы фага находятся в свободном состоянии или адгезированы к поверхности микросферы.

Эти результаты согласуются с данными А. Филиппова с соавт. [20], которые, используя мутанты штамма *Y. pestis* CO92, показали, что рецептор фага L-413C ассоциирован с липополисахаридом, точнее, N-ацетилглюкозамином наружного кора.

Как было показано нами ранее, ЛПС-EV значим и в рецепции фага d’Herelle-m. Однако, если доля обоих фагов, не связавшихся с микросферами, сенсibilизированными этим антигеном, оказалась одинаковой и ярко выраженной: $58.5 \pm 15.1\%$ для L-413C (рис. 1) и $58.5 \pm 19.9\%$ для фага d’Herelle-m [19], то в растворе ЛПС-EV фаг d’Herelle-m практически не инактивировался (различие с контролем несущественно для $p = 0.05$) [19], в отличие от фага L-413C (рис. 1). Очевидно, названные различия объясняются особенностями механизмов рецепции двух фагов, в том числе различиями в локализации и степени доступности для фагов рецепторных участков на молекуле ЛПС, имеющей различные конформационные свойства при том или ином использованном в работе методе оценки адгезивности фагов.

Неожиданными оказались результаты определения роли в рецепции фага L-413C антигена PsaA. Если микросферы, покрытые препаратами антигена PsaA-нат и PsaA-рек, не адсорбировали на себя частицы фага, то инкубация фага в растворе этого антигена оставляла литически активными $60.9 \pm 8.5\%$ и $58.8 \pm 7.6\%$ частиц соответственно (рис. 1).

В параллельно проводившихся сравнительных экспериментах оценивали способность

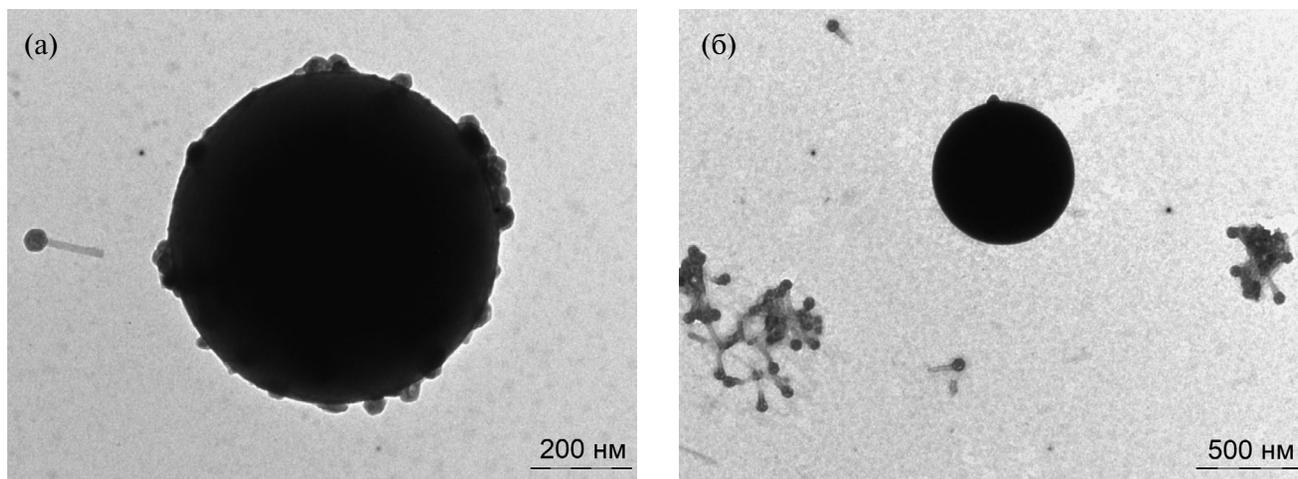


Рис. 2. Трансмиссионная электронная микроскопия. Микросферы “ЛПС-EV” (а) и “БСА” (б) после инкубации с суспензией фага L-413С.

этих же препаратов PsaA-нат и PsaA-рек, а также ЛПС-EV находящихся в растворе, инактивировать частицы фага d’Herelle-m. Результаты этих исследований подтвердили ранее полученные о слабо выраженной инактивации указанного фага препаратом PsaA-рек – в растворе оставалось $75.7 \pm 26.8\%$ [22] и препаратом ЛПС-EV – $83.3 \pm 14.2\%$ частиц фага, способных к лизису бактерий [19]. Вместе с тем, доля литически активных частиц фага d’Herelle-m после инкубации с микросферами, покрытыми ЛПС-EV составила $58.5 \pm 19.9\%$ [19], то есть практически столько же, сколько при использовании фага L-413С (рис. 1).

Несмотря на то, что проведенные эксперименты включали использование одних и тех же препаратов антигена PsaA, результаты, полученные с использованием двух вышеназванных методов, оказались прямо противоположными в отношении двух препаратов антигена. Объяснением такому кажущемуся противоречию могли служить известные данные литературы о том, что результаты подобных исследований во многом зависят от неоднородности физико-химических свойств поверхности биомолекул, в частности, белков, что может приводить к разнородной ориентации молекул при их пассивной адсорбции на твердом субстрате. Кроме того, твердые поверхности могли иметь гетерогенный химический состав, что также объясняет вариативность взаимодействия белок – субстрат. Различия в условиях проведения адсорбции, например, наличие соли или ее концентрация, также могли резко менять картину ориентации молекул на субстрате и результаты их взаимодействия с целевым биообъектом, в данном случае бактериофагом [23, 24]. Молекулы антигена PsaA в растворе, очевидно, имели больше вариантов связывания с частицами фага по сравнению с иммобилизованным на

микросферах антигеном. Косвенно на это указывает сопоставление результатов взаимодействия с фагом и других антигенов *Y. pestis*, оценка которых была проведена двумя методами – во всех случаях средние значения доли литически активных частиц фага, остающихся в растворе, оказались несколько выше при использовании антигенов, адсорбированных на поверхности микросфер (рис. 1). Однако, резкая, практически полная инактивация фага зарегистрирована только для ЛПС и, в меньшей мере, для двух препаратов антигена PsaA, находящихся в растворе. Разница в результатах экспериментов с микросферами, покрытыми двумя этими антигенами, объясняется, по-видимому, тем, что при иммобилизации на полистироле происходит блокировка структур антигенов, способных связываться с фагом – от полной для PsaA до частичной для ЛПС.

Учитывая неоднозначные результаты оценки роли антигена PsaA в рецепции фага L-413С, полученные с помощью двух охарактеризованных выше методов, представлялось целесообразным провести подобные исследования с использованием штамма *Y. pestis* с нокаутом гена *psaA*. В этой работе были использованы исходный штамм *Y. pestis* EV, а также его изогенный вариант, дефектный по биосинтезу белка PsaA. Культуры этих бактерий выращивали в жидкой питательной среде LB с pH ~7.0 и pH ~6.0. Биосинтез антигена PsaA происходит при температуре 37°C и низких значениях pH. Для исключения вклада в рецепцию фага компонентов микробной клетки углеводной природы, во всяком случае ЛПС, каждую из четырех вариантов культур (EV и EVΔ*psaA*, выращенных при двух значениях pH) обрабатывали (и не обрабатывали) раствором NaIO₄ (100 мМ) в течение 2 ч с последующей отмывкой SM.

Таблица 1. Значимость антигена PsaA *Y. pestis* в рецепции фага L-413С, оцененная с помощью нокаута EVΔpsaA

Вариант <i>Y. pestis</i>	pH среды выращивания	Обработка NaJO ₄	*Количество фага в надосадочной жидкости, %, X _{mean} ± 95% CI	Результаты ТИФА (ОП ₄₉₂), X _{mean} ± 95% CI
EV	6.0	–	33 ± 9	1.79 ± 0.52
		+	110 ± 14	1.35 ± 0.30
	7.0	–	42 ± 11	0.39 ± 0.08
		+	104 ± 13	0.30 ± 0.05
EVΔpsaA	6.0	–	16 ± 9	0.39 ± 0.08
		+	104 ± 11	0.31 ± 0.04
	7.0	–	32 ± 13	0.40 ± 0.13
		+	100 ± 22	0.38 ± 0.14

* Доля литически активных частиц фага, не связавшихся с бактериальными клетками после их коинкубации; 95% CI – доверительный интервал для $p = 0.95$.

Представленные в табл. 1 результаты подтвердили иммунохимическую инертность нокаута EVΔpsaA в ТИФА с антисывороткой к PsaA антигену и способность клеток исходного варианта EV к продукции этого антигена в жидкой питательной среде при pH 6.0.

Как показали результаты высева по Грация надосадочных жидкостей после центрифугирования суспензий, содержащих бактериальные клетки и частицы бактериофага, PsaA-антиген в составе микробной клетки вакцинного штамма *Y. pestis* EV не способствовал адгезии фага L-413С, как это видно из табл. 1. Более того, при выращивании бактериальных культур в жидкой питательной среде при pH 6.0 доля фага, связавшегося с клетками исходного штамма EV, продуцирующего PsaA-антиген, оказалась существенно ниже ($p < 0.05$) по сравнению с его изогенным вариантом EVΔpsaA, дефектным по биосинтезу антигена. Это могло быть связано с изменением поверхностной структуры клеток варианта-нокаута в процессе его получения, что могло привести к повышению доступности для фага ЛПС – основного, если не единственного, рецептора. Нельзя исключить также и того, что делеция *pgt* локуса хромосомной ДНК вирулентного штамма-прародителя штамма EV привела не только к прекращению биосинтеза ряда факторов патогенности чумного микроба [25], но и к конформационным изменениям поверхностных структур бактерии. По этой причине экспрессия в том числе PsaA-антигена на поверхности бактерий вакцинного штамма EV могла существенно отличаться от таковой вирулентных штаммов возбудителя и вследствие этого опосредовать изменения в проявлении биологических свойств, в частности, рецепции фага L-413С. Следует также отметить тенденцию к снижению адгезивности фага L-413С к клеткам обоих сравниваемых

вариантов *Y. pestis* при повышении значения pH с 6.0 до 7.0 (табл. 1), что могло объясняться экранированием ЛПС поверхностными белками, которые лучше экспрессируются при температуре культивирования 37°C и нейтральных значениях pH питательной среды, такими как F1, белки системы секреции III типа. Обработка культур вариантов EV и EVΔpsaA периодатом натрия приводила к полному прекращению адгезии фага к клеткам безотносительно к значению pH питательной среды. Последнее лишнее раз подтверждало значимость ЛПС *Y. pestis* в качестве рецептора фага L-413С.

Учитывая способность антигена PsaA связываться с Fc-фрагментом IgG человека [26], апо-липпротеином В сыворотки крови человека [16], фосфатидилхолином эпителиальных альвеолярных клеток человека [27], галактозильными остатками гликофинголипидов эукариотических клеток нескольких типов [28], а также полученные в этой работе результаты, можно предположить, что молекула антигена включает поверхностные домены, опосредующие высокую неспецифическую адгезию к ряду абиотических (например, полистирол микросфер) и биотических субстратов различной химической природы. Последнее объясняет неспособность сенсibilизированных белком PsaA микросфер связывать частицы фага, которые так же достаточно хорошо взаимодействовали с указанными доменами антигена, о чем может свидетельствовать выраженная адгезивность фага L-413С к нативной форме антигена в растворе (рис. 1). По-видимому, этот реакционноспособный участок молекулы PsaA-антигена не экспрессируется на поверхности микробной клетки штамма EV, но участвует в связывании образующего пили белка PsaA с нижерасположенными мембранными структурами бактерии.

Оценивая экспериментальные данные относительно значимости поверхностных антигенов *Y. pestis* в адгезии к фагу L-413C, следует отметить существенные различия между этим фагом и другими чумными фагами, используемыми в диагностической и исследовательской практике. Несмотря на показанную способность ЛПС *Y. pestis* участвовать в рецепции большинства специфических фагов, относящихся к нескольким группам, отдельные участки молекулы ЛПС, вовлеченные в механизм их рецепции, не идентичны [11]. Для нескольких чумных фагов показано участие в адгезии и других поверхностных антигенов бактериальной клетки. Так, T7-подобный бактериофаг Yер-phi использует для адгезии, помимо ЛПС, белки Ail и OmpF [29, 30], бактериофаг Покровской – белки Ail и YарF [22], бактериофаг псевдотуберкулезный диагностический (или d'Herelle-m или YpsP-G) – порины OmpF и, возможно, OmpC *Y. pseudotuberculosis* [19]. Для двух последних упомянутых фагов антиген PsaA оказался незначим в качестве рецепторной структуры [22].

Учитывая разнообразие чумных фагов по их морфологии, антигенности и другим свойствам, есть основания считать возможным составление фагового “коктейля”, эффективного для лечения этого тяжелейшего заболевания, вызываемого различными штаммами возбудителя. Одним из компонентов такого “коктейля”, по-видимому, должен стать фаг L-413C. Его скорее всего нельзя отнести к числу высоковирулентных фагов, во всяком случае, в условиях *in vitro* [11], однако вследствие его высокой, возможно наибольшей среди чумных фагов, универсальности в выявлении всего разнообразия штаммов возбудителя чумы [13], вероятность включения фага L-413C в состав разрабатываемого “коктейля” достаточно высока.

Полученные результаты подтвердили значимость в рецепции фага L-413C липополисахарида *Y. pestis*. Если этот антиген, иммобилизованный на поверхности микросфер, показал приблизительно одинаковую способность связывать частицы фагов L-413C и d'Herelle-m, то в растворе ЛПС инактивирует фаг L-413C в значительно большей мере по сравнению с фагом d'Herelle-m (рис. 1) и [19]. Образующий пили белок PsaA в растворенном в воде виде оказался способным инактивировать литическую активность этого фага, но не проявлял этого свойства, будучи связанным с полистирольными микросферами или в составе микробной клетки вакцинного штамма EV. Вместе с тем, как было установлено ранее [22], PsaA не связывается с чумными фагами Покровской и d'Herelle-m ни в растворе, ни в связанном с микросферами виде. Показанная в работе способность белка PsaA инактивировать частицы фага L-413C в растворе наряду с известными данными об участии этого антигена

в адгезии иерсиний к эукариотическим клеткам нескольких типов, способности инициировать гемагглютинацию эритроцитов барана, опосредовать антифагоцитарную активность, ингибировать продукцию антител макроорганизмом, реакцию митогензависимой бласттрансформации и др. [31–33] свидетельствует о высокой и, по-видимому, неспецифической адгезивности антигена к биотическим структурам различного химического состава.

Таким образом, приведенные выше результаты еще раз подчеркнули разницу в механизмах адсорбции чумных фагов, определяемую особенностями их морфологии, химического состава, а также пространственной организацией рецепторных структур наружной мембраны возбудителя. Представленные экспериментальные результаты подтвердили ранее установленную значимость в рецепции фага L-413C липополисахарида *Y. pestis*. Иные, использованные в работе поверхностные антигены этого микроба (YарF, YарM, Ail, F1), не проявляли этого свойства. Способность взаимодействовать с фагом L-413C показана для препаратов антигена PsaA, нативного и рекомбинантного, находящегося в растворе. PsaA в составе бактериальной клетки или будучи иммобилизованным на поверхности полистирольной микросферы не способствовал их взаимодействию с частицами фага. Отмеченное противоречие объясняется, по-видимому, различиями в агрегатном состоянии антигена, определяющих конформационные особенности и доступность для взаимодействия с фагом реакционноспособных групп белка.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ. Работа выполнена в рамках отраслевой научно-исследовательской программы Роспотребнадзора на 2021–2025 гг. “Научное обеспечение эпидемиологического надзора и санитарной охраны территории Российской Федерации. Создание новых технологий, средств и методов контроля и профилактики инфекционных и паразитарных болезней”.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ. Протокол экспериментов с животными одобрен комитетом по биоэтике ФБУН ГНЦ ПМБ (No P05–28). Все работы с животными проводились в соответствии с ГОСТ 33216–2014 “Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными”.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Galimand M., Courvalin P. Plague Treatment and Resistance to Antimicrobial agents. In: Yersinia: Systems Biology and Control. / Eds. E. Carniel and

- B.J. Hinnebusch. Norfolk: Caister Academic Press, 2012. P. 109–114.
<https://doi.org/10.1128/AAC.00306-06>
2. Kiefer D., Dalantai G., Damdindorj T., Riehm J.M., Tomaso H., Zöller L. et al. // Vector Borne Zoonotic Diseases. 2012. V. 12. № 3. P. 183–188.
<https://doi.org/10.1089/vbz.2011.0748>
 3. Cabanel N., Bouchier C., Rajerison M., Carniel E. // Int. J. Antimicrob. Agents. 2018. V. 51. № 2. P. 249–254.
<https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2017.09.015>
 4. Guiyoule A., Gerbaud G., Buchrieser C., Galimand M., Rahalison L., Chanteau S. et al. // Emerg. Infect. Dis. 2001. V. 7. № 1. P. 43–48.
<https://doi.org/10.3201/eid0701.010106>
 5. Welch T.J., Fricke W.F., McDermott P.F., White D.G., Rosso M.L., Rasko D.A. et al. // PLoS ONE. 2007. V. 2. № 3. e309.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0000309>
 6. Sebbane F., Lemaître N. // Biomolecules. 2021. V.11. № 5. 724.
<https://doi.org/10.3390/biom11050724>
 7. Vagima Y., Gur D., Aftalion M., Moses S., Levy Y., Makovitzki A. et al. // Viruses. 2022. V. 14. № 4. 688.
<https://doi.org/10.3390/v14040688>
 8. Xiao L., Qi Z., Song K., Lv R., Chen R., Zhao H. et al. // Front. Cell. Infect. Microbiol. 2023. V. 13. 1174510.
<https://doi.org/10.3389/fcimb.2023.1174510>
 9. d'Hérelle F. // Presse Med. 1925. V. 33. P. 1393–1394.
 10. Moses S., Vagima Y., Tidhar A., Aftalion M., Mamroud E., Rotem S. et al. // Viruses. 2021. V. 13. № 1.
<https://doi.org/10.3390/v13010089>
 11. Filippov A.A., Sergueev K.V., Nikolich M.P. // Bacteriophage. 2012. V. 2. № 3. P. 186–189.
<https://doi.org/10.4161/bact.22407>
 12. Garcia E., Chain P., Elliott J.M., Bobrov A.G., Motin V.L., Kirillina O. et al. // Virology. 2008. V. 372. № 1. P. 85–96.
<https://doi.org/10.1016/j.virol.2007.10.032>
 13. Born F., Braun P., Scholz H.C., Grass G. // Pathogens. 2020. V. 9. № 8. 611.
<https://doi.org/10.3390/pathogens9080611>
 14. Filippov A.A., Sergueev K.V., He Y., Nikolich M.P. // Advances in Yersinia Research. New York: Springer, 2012. P. 123–134.
https://doi.org/10.1007/978-1-4614-3561-7_16
 15. Datsenko K.A., Wanner B.L. // Proceedings of the National Academy of Sciences. 2000. V. 97. № 12. P. 6640–6645.
<https://doi.org/10.1073/pnas.120163297>
 16. Makoveichuk E., Cherepanov P., Lundberg S., Forsberg A., Olivecrona G. // Journal of Lipid Research. 2003. V. 44. № 2. P. 320–330.
<https://doi.org/10.1194/jlr.M200182-JLR200>
 17. Westphal O., Jann K. // Methods Carbohydr. Chem. 1965. V. 5. P. 83–91.
 18. Konyshv I.V., Ivanov S.A., Kopylov P.H., Anisimov A.P., Dentovskaya S.V., Byvalov A.A. // Appl. Biochem. Microbiol. 2022. V. 58. № 4. P. 394–400.
<https://doi.org/10.1134/S0003683822040081>
 19. Dudina L.G., Novikova O.D., Portnyagina O.Yu., Khomenko V.A., Konyshv I.V., Byvalov A.A. // Appl. Biochem. Microbiol. 2021. V. 57. № 4. P. 426–433.
<https://doi.org/10.1134/S0003683821040049>
 20. Filippov A.A., Sergueev K.V., He Y., Huang X.Z., Gnade B.T., Mueller A.J. et al. // PLoS One. 2011. V. 6. № 9. e25486.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0025486>
 21. Chauhan N., Wrobel A., Skurnik M., Leo J.C. // Proteomics Clin. Appl. 2016. V. 10. № 10. P. 949–963.
<https://doi.org/10.1002/prca.201600012>
 22. Byvalov A.A., Dudina L.G., Ivanov S.A., Kopylov P.K., Svetoch T.E., Konyshv I.V. et al. // Bull. Exp. Biol. Med. 2022. V. 174. № 2. P. 241–245.
<https://doi.org/10.1007/s10517-023-05681-w>
 23. Džupponová V., Žoldák G. // Biophysical Chemistry. 2021. V. 275. 106609.
<https://doi.org/10.1016/j.bpc.2021.106609>
 24. Cerofolini L., Fragai M., Luchinat C., Ravera E. // Biophysical Chemistry. 2020. V. 265. 106441.
<https://doi.org/10.1016/j.bpc.2020.106441>
 25. Anisimov A.P., Lindler L.E., Pier G.B. // Clinical Microbiology Reviews. 2004. V. 17. № 2. P. 434–464.
<https://doi.org/10.1128/cmr.17.2.434-464.2004>
 26. Zav'yalov V.P., Abramov V.M., Cherepanov P.G., Spirina G.V., Chernovskaya T.V., Vasiliev A.M. et al. // FEMS Immunology & Medical Microbiology. 1996. V. 14. № 1. P. 53–57.
<https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.1996.tb00267.x>
 27. Galvan E.M., Chen H., Schifferli D.M. // Infection and Immunity. 2007. V. 75. № 3. P. 1272–1279.
<https://doi.org/10.1128/iai.01153-06>
 28. Payne D., Tatham D., Williamson E.D., Titball R.W. // Infection and Immunity. 1998. V. 66. № 9. P. 4545–4548.
<https://doi.org/10.1128/iai.66.9.4545-4548.1998>
 29. Zhao X., Cui Y., Yan Y., Du Z., Tan Y., Yang H. et al. // Journal of Virology. 2013. V. 87. № 22. P. 12260–12269.
<https://doi.org/10.1128/jvi.01948-13>
 30. Xiao L., Qi Z., Song K., Lv R., Chen R., Zhao H. et al. // Front Cell Infect Microbiol. 2023. V. 13. 1174510.
<https://doi.org/10.3389/fcimb.2023.1174510>
 31. Yang Y., Merriam J.J., Mueller J.P., Isberg R.R. // Infection and Immunity. 1996. V. 64. № 7. P. 2483–2489.
<https://doi.org/10.1128/iai.64.7.2483-2489.1996>
 32. Pakharukova N., Roy S., Tuittila M., Rahman M.M., Paavilainen S., Ingars A.K. et al. // Molecular Microbiology. 2016. V. 102. № 4. P. 593–610.
<https://doi.org/10.1111/mmi.13481>
 33. Anisimov A.P. // Molekuliarnaia Genetika, Mikrobiologiya i Virusologiya. 2002. № 3. P. 3–23.

The Role of *Yersinia pestis* Antigens in Reception of the Plague Diagnostic Bacteriophage L-413C

A. A. Byvalov^{a, b, *}, L. G. Dudina^{a, b}, T. B. Kravchenko^c, S. A. Ivanov^c, I. V. Konyshev^{a, b},
N. A. Morozova^a, A. V. Chernyadiev^a, S. V. Dentovskaya^{c, **}

^a Federal State Budgetary Educational Institute of Higher Education "Vyatka State University",
Kirov, 610000 Russia

^b Institute of Physiology of the Komi Scientific Center of the Federal Research Center "Komi Scientific Center of the Ural
Branch of the Russian Academy of Sciences", Syktyvkar, 167982 Russia

^c The Federal Budgetary Institution of Science "State Scientific Center for Applied Microbiology and Biotechnology",
Obolensk, 142279 Russia

*e-mail: byvalov@nextmail.ru

**e-mail: info@obolensk.org

The role of surface antigens of *Yersinia pestis* in reception of the phage L-413C was experimentally evaluated. Based on the methods of the phage inactivation after its co-incubation with the soluble or bead-bounded antigens, an importance of LPS from the plague microbe in the phage reception and inability to bind a capsular antigen F1, Ail protein and two autotransporters YapF and YapM were confirmed. The native and recombinant PsaA, being solved, significantly inhibited the lytic activity of the phage in comparison with the bead-bound antigens. The knockout EV cells ($\Delta psmA$) are able to bind the phage particles as well as the wild strain. The use of three methods to evaluate the role of PsaA antigen in phage L-413C reception gave contradictory results. On the one hand the reactive domains of PsaA are able to interact with phage particles in solution. At the same time, these domains appear to determine nonspecific binding of PsaA protein to the underlying bacterial cell structures and polystyrene microsphere, preventing phage adhesion.

Keywords: bacteriophage L-413C, antigen, *Yersinia pestis*, receptor