На правах рукописи

БОРИСОВА СВЕТЛАНА ВЛАДИМИРОВНА

ОПТИМИЗАЦИЯ МЕТОДИЧЕСКИХ ПРИЕМОВ ИЗУЧЕНИЯ ФУНКЦИОНАЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ КЛЕТОК И ПОЛУЧЕНИЯ СЕКРЕТИРУЕМЫХ СТРЕСС-БЕЛКОВ *FRANCISELLA TULARENSIS*

1.5.11 – Микробиология

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Саратов – 2025

Работа выполнена в Федеральном казенном учреждении науки «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (ФКУН Российский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора)

Научный руководитель: **Волох Оксана Александровна**
кандидат биологических наук

Официальные оппоненты: **Шелудько Андрей Вячеславович** – доктор биологических наук, заведующий лабораторией генетики микроорганизмов Института биохимии и физиологии растений и микроорганизмов – обособленного структурного подразделения Федерального государственного бюджетного учреждения науки Федерального исследовательского центра «Саратовский научный центр Российской академии наук»

Мазепа Андрей Владимирович – кандидат медицинских наук, ведущий научный сотрудник отдела эпидемиологии Федерального казенного учреждения 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

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации

Защита диссертации состоится «___» _____2026 года в ___ часов на заседании диссертационного совета 64.1.006.01 по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук при Федеральном казенном учреждении науки «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по адресу: 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. Тел. (8452) 26-21-31, факс (8452) 51-52-12.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке и на сайте http://www.microbe.ru ФКУН Российский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора.

Автореферат разослан: «___» _____ 20__ г.

Ученый секретарь
диссертационного совета 64.1.006.01
доктор биологических наук Абрамова Елена Геннадьевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования и степень ее разработанности

Ежегодно в России и за рубежом регистрируется от 1000 до 4000 случаев заболевания туляремией [Гаевская Н.Е. и др., 2025], а эпидемические риски возникновения случаев заболевания среди восприимчивого населения связаны со стабильностью природных очагов инфекции [Rouco C. et al., 2023], которые, в свою очередь, определяются биологическими особенностями туляремийного микроба [Steiner D.J. et al., 2014; Travis B.A. et al., 2021]. Изучение адаптационных механизмов и факторов патогенности возбудителя туляремии является актуальным направлением исследований.

Важной особенностью *Francisella* spp. является способность реплицироваться в эукариотических клетках, противостоя защитным механизмам макрофагов за счёт детерминант устойчивости [Kubelkova K. et al., 2021; Radlinski L.C. et al., 2018]. Ключевую роль в адаптации играют экскретируемые стресс-белки, такие как шаперонный комплекс GroEl/GroEs, обеспечивающий защиту от теплового шока, и бактериоферритин (Bfr), участвующий в детоксикации активных форм кислорода [Noah C.E. et al., 2010; Fletcher J.R. et al., 2018]. Эти белки, обнаруживаемые в культуральной жидкости, могут служить маркерами стрессового воздействия на патоген [Lee B.Y. et al., 2006]. Обобщая имеющиеся данные о свойствах секретируемых антигенов, следует отметить, что их дальнейшее исследование представляет значительный интерес для разработки новых диагностических систем и профилактических препаратов.

Оценка функционального состояния бактериальных клеток важна для контроля качества штаммов-продуцентов и оптимизации культивирования. Традиционные методы (цитохимические, культуральные) часто требуют длительного времени и субъективны. Современные подходы, включая молекулярно-генетические (ПЦР) и биофизические (электрооптический анализ), позволяют оперативно и объективно оценивать жизнеспособность и физиологическую активность *F. tularensis* [Бибиков Д.Н., 2021; Brudal E. et al., 2013].

Таким образом, исследование стресс-белков и применение современных методов анализа функционального состояния клеток перспективны для разработки новых диагностических и профилактических препаратов против туляремии. Актуальным направлением в исследовании стратегий выживания *F. tularensis* и механизмов его адаптации является применение комплексного подхода, объединяющего современные молекулярно-генетические, биофизические и иммунохимические методы для многоуровневого анализа – от молекулярных процессов до клеточных взаимодействий.

Цель исследования: разработать комплексный методический подход для оценки

функционального состояния клеток *Francisella tularensis* при стрессовых воздействиях, получить секретируемые стресс-белки туляремийного микроба, определить их прикладной потенциал.

Задачи исследования:

1. Разработать способ определения уровня экспрессии генов стресс-белков (*groEl, bfr, rpoH*) молекулярно-генетическими методами (ОТ-ПЦР; цкПЦР).

2. Экспериментально обосновать использование метода электрооптического анализа для определения физиологического состояния клеток туляремийного микроба в стресс-условиях.

3. Оценить особенности экспрессии генов стресс-белков *F. tularensis* разных штаммов в стрессовых условиях: температурный стресс, перекисное окисление, взаимодействие с антибиотиками, клетками макроорганизма.

4. Разработать эффективный способ получения секретируемых стрессовых белков туляремийного микроба (HSP, GroEl/GroEs, Bfr), изучить их свойства, участие в формировании иммунитета к туляремии и диагностическую значимость.

5. Определить прикладной потенциал разработанного комплексного методического подхода для оценки функционального состояния клеток *F. tularensis* при стрессовых воздействиях.

Научная новизна. С использованием впервые сконструированных специфичных праймеров и зондов к ключевым генам стресс-ответа (*bfr, groEl, rpoH*) определен уровень экспрессии этих генов у *F. tularensis* с применением ОТ-ПЦР и цкПЦР. Показано, что разработанная система позволяет эффективно контролировать динамику экспрессии генов-регуляторов стрессовой реакции у туляремийного микроба, что имеет большое значение для изучения его адаптационных механизмов.

Для определения физиологического состояния клеток туляремийного микроба при взаимодействии со стресс-факторами в режиме реального времени впервые использован метод электрооптического мониторинга. Показана применимость данного метода для изучения всех штаммов туляремийного микроба, независимо от подвидовой принадлежности, в диапазоне показателя анизотропии поляризуемости от 80 до 200 усл. ед. при частоте исследования бактериальной культуры 900 кГц и 2100 кГц.

Проведение сравнительного анализа степени воздействия стресс-условий на клетки *F. tularensis* позволило оптимизировать условия культивирования штамма-продуцента и разработать способ получения секретируемых стресс-белков. Впервые выделены и охарактеризованы антигены HSP, GroEl/GroEs и Bfr вакцинного штамма туляремийного микроба. Полученные белки имели следующие молекулярные массы: Bfr – 17 кДа,

GroEl/GroEs – 57/10 кДа. Антигенный комплекс HSP имел в своем составе 5 мажорных полос с молекулярными массами от 10 до 90 кДа. Установлено, что все они являются видоспецифичными и регистрируются у *F. tularensis* независимо от подвидовой принадлежности штаммов. Приоритетность работы в данном направлении подтверждена патентом на изобретение №2830065 «Способ получения секретируемых стресс-белков *Francisella tularensis*».

Впервые установлена высокая протективная эффективность антигенов Bfr, GroEl/GroEs и HSP, полученных из вакцинного штамма *F. tularensis*, на модели экспериментальной туляремийной инфекции у белых мышей. Иммунизация животных любым из исследуемых белков достоверно ($p < 0,05$) увеличивала продолжительность жизни и обеспечивала выживаемость более 50% особей, тогда как в контрольной группе, зараженной вирулентным штаммом *F. tularensis* 503/840, наблюдалась 100 % летальность на 6-8 сутки.

В ходе исследования впервые разработан комплексный методический подход, позволяющий проводить многоуровневую оценку воздействия стрессовых факторов на клетки *F. tularensis* и включающий электрооптический анализ для оценки изменений на популяционном и клеточном уровнях, ИФА для изучения субклеточных процессов, а также ПЦР для оценки уровня экспрессии генов-регуляторов стресс-ответа. Данные методы позволяют не только оценивать жизнеспособность бактериальной культуры и воздействие факторов среды на клеточные структуры, но и проводить количественный анализ секреции стресс-белков (Bfr, GroEl/GroEs, HSP) для их последующей очистки и характеристики.

Теоретическая и практическая значимость. Теоретический аспект связан с комплексным исследованием физиологического состояния *F. tularensis* на генетическом, молекулярном и клеточном уровнях при воздействии на микроорганизм различных стресс-факторов. Полученные данные вносят значительный вклад в определение закономерностей зависимости секреции стресс-белков от определенных условий и будут использованы для получения протективных антигенов туляремийного микроба. Изложенные в диссертации результаты служат теоретической основой для исследований, целью которых является изучение адаптационных механизмов возбудителей инфекционных заболеваний бактериальной природы.

Разработанный комплексный подход имеет важное значение для фундаментальных исследований механизмов бактериальной адаптации, а также для практических аспектов лабораторной диагностики и вакцинопрофилактики туляремии, объединяя теоретические и прикладные подходы изучения стресс-ответа патогенных микроорганизмов. Полученные результаты создают основу для разработки новых диагностических систем и усовершен-

ствования существующих методов профилактики этого опасного заболевания.

Разработанные праймеры и зонды к генам стресс-ответа *F. tularensis* (*bfr, groEl, rpoH*) позволяют количественно оценить их экспрессию методами ОТ-ПЦР и цкПЦР. Установлена высокая чувствительность методов при изучении различных подвидов туляремийного микроба: до 10^4 м.к./мл для ОТ-ПЦР и до 10^1 м.к./мл для цкПЦР.

Использование электрооптического анализа обеспечивает оперативный мониторинг физиологического состояния бактериальной культуры в режиме реального времени, включая условия глубинного культивирования. Результаты экспериментальной работы использованы при разработке базы данных «Система протоколирования и анализа результатов процесса аппаратного глубинного культивирования бактерий» (Свидетельство о государственной регистрации базы данных № 2023622431, заявл. 03.07.2023, опубл. 17.07.2023. Бюл. №7).

Полученные новые данные об экскретируемых антигенах включены в созданную базу данных «Биотехнологически значимые антигены возбудителей особо опасных инфекций» (Свидетельство о государственной регистрации базы данных RU2025622621, заявл. 21.02.2025, опубл. 18.06.2025. Бюл. №6), что расширило её информационную ценность для разработки диагностических и профилактических препаратов.

В ходе работы впервые разработаны и успешно апробированы схемы иммунизации кроликов, включающие использование наночастиц коллоидного золота и хитозана (Cs) в качестве адъювантов для антигенов. Данные схемы позволили получить поликлональные сыворотки, обладающие специфичностью и широким спектром узнавания в отношении *F. tularensis* разных подвидов.

Экспериментально обоснованы условия длительного хранения рабочей культуры вакцинного штамма туляремийного микроба (до 2-х лет), обеспечивающие сохранение показателя остаточной вирулентности в диапазоне 10^2–10^6 микробных клеток, что соответствует требованиям нормативного документа МУ 3.3.1.2161-07 «Основные требования к вакцинным штаммам туляремийного микроба». Проведенные исследования показали, что криоконсервация является оптимальным методом хранения рабочей культуры вакцинного штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ в течение длительного времени без изменения его свойств.

Разработаны следующие методические рекомендации учрежденческого уровня внедрения:

1. «Электрооптический мониторинг жизнеспособности вакцинного штамма туляремийного микроба» (одобрены Ученым Советом и утверждены директором РосНИПЧИ «Микроб», протокол № 3 от 05.11.2020).

2. «Получение экскретируемых стресс-белков *Francisella tularensis* 15 НИИЭГ» (одобрены Ученым Советом и утверждены директором РосНИПЧИ «Микроб», протокол № 4 от 23.06.2022).

Положения, выносимые на защиту:

1. Разработаны специфические наборы олигонуклеотидных праймеров и зондов к консервативным участкам стресс-генов *bfr*, *groEl* и *rpoH*, позволяющие количественно оценивать их уровень экспрессии у различных подвидов *F. tularensis* методом ПЦР в реальном времени с высокой аналитической чувствительностью и специфичностью.

2. Применение метода электрооптического анализа позволяет в режиме реального времени определять физиологическое состояние клеток туляремийного микроба при взаимодействии со стресс-факторами.

3. Секретируемые стресс-белки *F. tularensis* (HSP, GroEl/GroEs, Bfr) способны индуцировать специфический иммунный ответ, обеспечивают эффективную защиту биологических моделей от экспериментальной туляремийной инфекции. Белки GroEl/GroEs и HSP позволяют детектировать специфические антитела в сыворотках крови вакцинированных и переболевших животных. Полученные поликлональные антисыворотки позволяют достоверно детектировать штаммы *F. tularensis* разных подвидов (*tularensis*, *mediasiatica*, *holarctica*, *novicida*) в биологических образцах.

4. Комплексный методический подход к исследованию функционального состояния клеток *F. tularensis* обеспечивает всестороннюю оценку влияния стресс-факторов (температурный стресс, перекисное окисление, длительное хранение, антибактериальные препараты) на патоген, дополняет способы изучения механизмов взаимодействия возбудителя туляремии с клетками макроорганизма.

Связь работы с научными программами и личный вклад автора в исследования. Работа выполнена в лаборатории холерных вакцин отдела профилактических препаратов ФКУН Российский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора в период с 2018 по 2025 гг. в рамках отраслевых НИР: 70-2-17 «Разработка и совершенствование биотехнологий промышленного выпуска иммунобиологических средств профилактики и диагностики инфекционных заболеваний бактериальной и вирусной природы» (номер госрегистрации АААА-А16-116112810063-4), 83-2-20 «Совершенствование этапов производства и методов контроля лечебно-профилактических и диагностических препаратов» (номер госрегистрации АААА-А20-120012090035-1); 89-2-21 «Научно-прикладные аспекты производства и совершенствования препаратов для иммунопрофилактики и диагностики опасных бактериальных и вирусных инфекций» (номер госрегистрации АААА-А21-121012090066-4).

Автор лично участвовал в разработке концепции исследования, постановке цели и задач, планировании и проведении экспериментов, анализе и интерпретации полученных результатов, а также в подготовке научных публикаций и методических рекомендаций. Некоторые экспериментальные исследования проведены совместно с сотрудниками других отделов: к.б.н. Кузнецовым О.С. (атомно-силовая микроскопия); к.м.н. Тучковым И.В. (подбор праймеров и зондов); Степановым А.В. (синтез праймеров и зондов); д.б.н. Кравцовым А.Л. (цитофлуориметрические исследования), к.х.н. Красновым Я.М. (полногеномное секвенирование штаммов туляремийного микроба).

Степень достоверности и апробация работы. Достоверность работы основана на значительном объеме экспериментов и полученных в ходе исследования данных, их статистической обработке, соответствии теоретическим данным, применении современных актуальных методов исследования, соответствующих цели и задачам работы. Эксперименты проведены с использованием оборудования и контрольно-измерительных приборов, прошедших метрологическую поверку.

Материалы исследования были представлены и обсуждались на V Международной конференции молодых ученых: биотехнологов, молекулярных биологов и вирусологов (Кольцово, 2018); IV Всероссийском семинаре памяти профессора Ю.П. Волкова (Саратов, 2018); XI Региональной научной конференции «Исследования молодых ученых в биологии и экологии» СГУ имени Н.Г. Чернышевского (Саратов, 2019); XII Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых и специалистов Роспотребнадзора «Современные проблемы эпидемиологии, микробиологии и гигиены» (Ростов-на-Дону, 2020); Национальной научно-практической конференции, посвященной памяти доктора медицинских наук, профессора Л.Ф. Зыкина (Саратов, 2021); Всероссийской научно-практической конференции с международным участием, посвященной 100-летию академика И.Н. Блохиной «Эпидемиологический надзор за актуальными инфекциями: новые угрозы и вызовы» (Нижний Новгород, 2021); конгрессе с международным участием «Молекулярная диагностика и биобезопасность-2022» (Москва, 2022); ежегодных научно-практических конференциях «Итоги и перспективы фундаментальных и прикладных исследований в РосНИПЧИ «Микроб» (Саратов, 2018–2022). V Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Актуальные проблемы болезней, общих для человека и животных» (Ставрополь, 2024); III Всероссийской конференции с международным участием «Механизмы адаптации микроорганизмов к различным условиям среды обитания» (Байкальск, 2024).

Публикации. По материалам диссертационной работы опубликовано 20 научных работ, включая 1 патент на изобретение, 2 свидетельства о регистрации баз данных, 9 ста-

тей, 7 из которых включены в «Перечень ведущих рецензируемых научных журналов, рекомендованных ВАК Министерства образования и науки России».

Структура диссертации. Диссертация представлена на 151 странице и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, четырех глав собственных исследований, заключения и выводов. Работа иллюстрирована 28 таблицами и 20 рисунками. Библиографический список содержит 234 источника.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Обзор литературы. Рассмотрены основные сведения о методах исследования стресс-воздействия на бактериальную клетку, факторах адаптации туляремийного микроба к неблагоприятным условиям и основных стресс-белках *F. tularensis*. Литературные данные показывают актуальность и перспективность разработки комплексного подхода для изучения реакции возбудителя туляремии на стресс, а также для исследования секретируемых стресс-белков.

Материалы и методы исследования. Работа выполнена с использованием 9 штаммов *F. tularensis* разных подвидов и биоваров (*holarctica* eryR, eryS, *japonica*; *tularensis, mediasiatica, novicida*), а также 9 гетерологичных микроорганизмов. Все штаммы получены из Государственной коллекции патогенных бактерий ФКУН Российский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора. Работы с патогенами II-IV групп проводили в соответствии с СанПиН 3.3686-21. Для проведения экспериментов использовались химические реактивы с пометкой «хч» или «чда». Культивирование *F. tularensis* проводили на твёрдых (FT, Мюллера-Хинтона) и жидких (бульоны Мюллера-Хинтона, Чемберлена, Д-бульон, Т-бульон) средах при температуре 37 °С. Для объемного культивирования использовали лабораторный ферментер (рабочий объем 1 л) и шейкер-инкубатор. Гетерологичные штаммы культивировали на питательных средах Хоттингера и LB. В качестве биомоделей использовали мышей линии BALB/c, кроликов породы Шиншилла, морских свинок, полученных из питомника ФКУН «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора. Все экспериментальные процедуры с использованием животных были одобрены биоэтической комиссией института. Аномальную токсичность препаратов антигенов (HSP, GroEl/GroEs, Bfr) оценивали на моделях мышей и морских свинок при введении доз 100 и 1000 мкг, соответственно. Реакцию лейкоцитолиза проводили и учитывали в соответствии с МУ 3.1.2007-05. Выделение перитонеальных макрофагов и лимфоцитов проводили стандартными методами согласно МУ 3.3.1.2161-07. Протективную активность препаратов HSP, Bfr и GroEl/GroEs определяли на модели мышей линии BALB/c, иммунизированных однократно подкожно, при экспериментальном заражении вирулентным штаммом *F. tularensis* 503/840, рассчитывая ED_{50} и

LD_{50} по методу Кербера. Анализ выживаемости животных проводили с использованием метода Каплана-Мейера [Гланц С., 1998]. Препараты иммуноглобулинов получали из иммунных кроличьих сывороток путем осаждения сульфатом аммония. Основную фракцию антител (IgG) осаждали при степени насыщения 40 %.Экстракцию ДНК/РНК проводили наборами AxyPrep и PureLink RNA. ОТ-ПЦР выполняли на амплификаторе RotorGene 6000 (Qiagen, США). Относительный уровень экспрессии генов рассчитывали методом $2^{-\Delta\Delta Ct}$, цкПЦР проводили на системе ddPCR QX200 (Bio-Rad, США). Полногеномное секвенирование выполнено на платформе MGI DNBSEQ-G50RS (MGI, Китай). Концентрацию белка определяли методом Лоури, содержание липидов — бихроматным методом, нуклеиновых кислот — методом Спирина. Электрофорез в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия (SDS-PAGE) и иммуноблоттинг выполняли по стандартным методикам. Для определения наличия ЛПС гели окрашивали азотнокислым серебром с помощью набора реактивов «Silver Stain» (Bio-Rad, США). В иммуноферментном анализе (ИФА) и дот-ИФА (ДИА) использовали специфические экспериментальные иммуноглобулины, а также антивидовые антитела, меченные пероксидазой хрена. Физиологическое состояние клеток анализировали на системе электрооптического анализа EloTrace 3.0 (EloSystems, Германия). Конформационные изменения белков при нагревании исследовали на спектрофлуориметре Duetta (Horiba, Япония). Морфометрию клеток проводили на атомно-силовом микроскопе Solver P47-PRO (NT-MDT, Россия). Для оценки апоптоза и пролиферации клеток использовали проточную цитофлуориметрию на анализаторе «CyAn» (Beckman Coulter, США). Статистическую обработку данных проводили с использованием пакетов прикладных программ Excel и STATISTICA 12. Для анализа применяли коэффициент ранговой корреляции Спирмена и непараметрический дисперсионный анализ Краскела-Уоллиса. Статистически значимыми считали различия при уровне значимости $p \leq 0{,}05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

1. Разработка способа мониторинга стресс-адаптации туляремийного микроба молекулярно-генетическими методами.

Для подбора генов-кандидатов, пригодных для детекции уровня стрессового воздействия на *F. tularensis* методом ПЦР, был проведён анализ отечественных и зарубежных публикаций, посвящённых генам стресса и их детекции в пробах различного происхождения. В результате предварительно было отобрано пять генов: *bfr, groEl, rpoH, clpB* и *fslB*.

Для выявления взаимосвязей в экспрессии генов стресса и соответствующих белков был выполнен биоинформационный анализ с использованием базы данных STRING.

Поскольку литературные данные охватывали лишь отдельные подвиды возбудителя, особое внимание уделялось поиску универсальных генов, демонстрирующих стабильную экспрессию у всех подвидов *F. tularensis*. Для проверки консервативности последовательностей использовали алгоритм BLAST и анализ кривых плавления для различных подвидов. По результатам анализа наиболее подходящими генами оказались *rpoH, groEl* и *bfr*. В качестве референсного гена использовали 16S rRNA.

Праймеры и зонды для ПЦР в реальном времени были разработаны с помощью программы Primer BLAST. Методом термоградиентной ПЦР определена оптимальная температура отжига для всех олигонуклеотидов. Специфичность праймеров и зондов оценивали с использованием кДНК, полученной из суспензий различных подвидов *F. tularensis*, а также гетерологичных микроорганизмов (*Y. pestis, Y. pseudotuberculosis, V. cholerae*). Дополнительно оптимизировано количество матричной ДНК для ОТ-ПЦР.

Установлено, что все наборы праймеров и зондов специфичны к *F. tularensis* независимо от подвидовой принадлежности. В пробах, не содержащих кДНК возбудителя туляремии, флуоресцентный сигнал не детектировался. Оптимальная концентрация кДНК для ОТ-ПЦР составила 200 нг.

Для цкПЦР использовали те же праймеры и зонды при аналогичной температуре отжига. Оптимальная концентрация кДНК данного метода составила 100 нг. Методом цкПЦР подтверждена эффективность разделения положительных и отрицательных капель для всех исследуемых проб, что демонстрирует его пригодность для оценки стресс-ответа у *F. tularensis*.

2. Применение электрооптического анализа для определения физиологического состояния клеток туляремийного микроба в стресс-условиях

Электрооптический анализ бактериальных суспензий проводили на автоматизированной аналитической установке EloTrace. Для оценки жизнеспособности клеток регистрировали изменения электропроводности цитоплазмы (900 кГц) и цитоплазматической мембраны (2100 кГц), как наиболее чувствительных компонентов клетки к изменению условий [Pauly H. et al., 1962; Волошин А.Г. и др., 2017].

Оптимальные значения анизотропии поляризуемости (АП), соответствующие 100 % выживаемости, находились в диапазоне 81–200 усл. ед. для обеих частот (Таблица 1). Превышение этих значений указывало на накопление токсичных метаболитов, а снижение – на истощение и гибель клеток.

Таблица 1 – Корреляция показателей АП клеток и «жизнеспособность» культуры *F. tularensis* 15 НИИЭГ

Диапазон АП, усл. ед.		Жизнеспособность, %	Коэффициент корреляции Спирмена
900 кГц	2100 кГц		
0–20	0–20	0–10	0,82
21–80	21–80	25–70	0,94
81–200	81–200	71–100	0,96
>201	>201	0–10	0,8

Исследование штаммов различных подвидов *F. tularensis* (*tularensis, holarctica, mediasiatica, novicida*) показало сходные диапазоны АП и корреляцию с жизнеспособностью. Наибольшая точность корреляции наблюдалась на частоте 2100 кГц ($r_s \approx 0,9$; $p < 0,05$). Исключение составил бескапсульный штамм КМ-9 (Cap^-), у которого на частоте 900 кГц корреляционная зависимость отсутствовала, что может отражать специфику его цитоплазматической организации.

Установлено влияние питательной среды на электрооптические характеристики вакцинного штамма *F. tularensis* в условиях стресса. Эксперимент проводили на четырёх средах: Чемберлена (Ч), Мюллера-Хинтона (М-Х), Т-бульоне и Д-бульоне в контрольных (нормальные условия) и опытных вариантах (воздействие 5 мМ H_2O_2 и 42 °С).

Электрооптический анализ выявил изменения ориентационного спектра клеток при стрессе во всех средах. Наименьшее изменение электрооптических параметров под действием стресса наблюдалось при культивировании в Т-бульоне (Рисунок 1А), что связано со сложным составом данной среды, способным компенсировать повреждающее воздействие внешних факторов. Максимальная жизнеспособность в контроле отмечалась в среде Мюллера-Хинтона, однако стрессовые условия вызывали в ней наибольшее снижение АП (на 30 %).

Размер клеток измеряли методом электрооптического анализа. В качестве контрольного метода использовали атомно-силовую микроскопию. Между этими двумя методами была отмечена высокая корреляция ($r_s = 0,9$; $p < 0,05$) (Рисунок 1Б). В Д-бульоне и среде Чемберлена стресс приводил к увеличению размера клеток на 6–10 %, что связано с усилением синтеза капсульного вещества. В среде Мюллера-Хинтона наблюдалось уменьшение размера клеток на 10 %, свидетельствующее о повреждении клеточных структур. В Т-бульоне значительных изменений размера не отмечено.

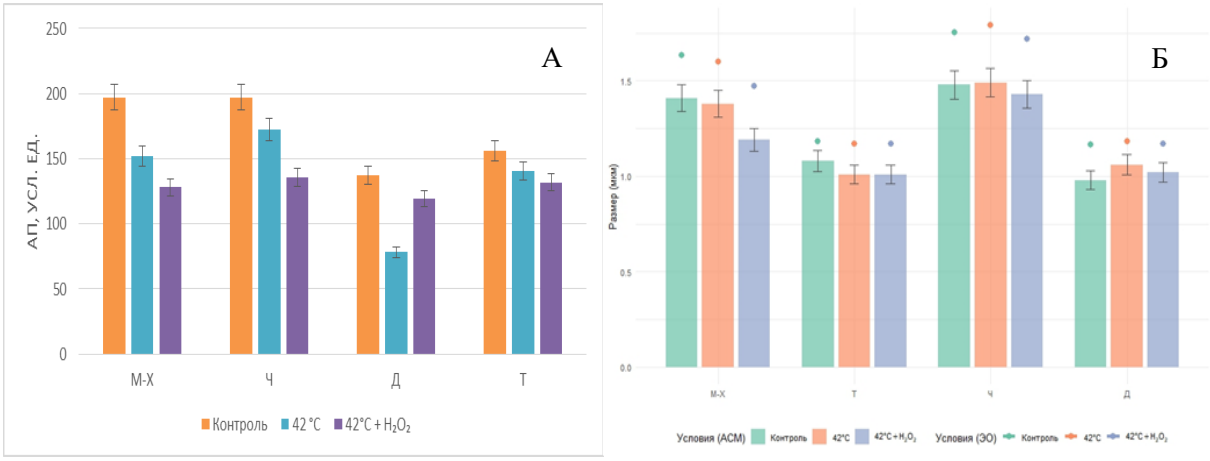


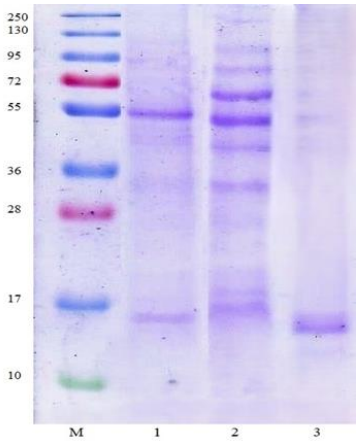
Рисунок 1 – Сравнительная характеристика анизотропии поляризуемости при частоте ориентирующего поля 900 кГц (А) и размеров клеток туляремийного микроба в разных условиях методом АСМ и ЭО анализа (Б)

Таким образом, электрооптический анализ позволяет в реальном времени оценивать физиологическое состояние клеток *F. tularensis* при стрессе с высокой точностью. Метод эффективен для контроля стабильности вакцинного штамма и оптимизации условий культивирования.

3. Получение и характеристика секретируемых стресс-белков

Для исследования влияния питательной среды на секрецию стресс-белков клетками туляремийного микроба были использованы ранее описанные питательные среды. Установлено, что при культивировании на Т-бульоне, бульоне Мюллера-Хинтона и среде Чемберлена возбудитель туляремии секретирует стабильный набор из 12 белков как в контрольных условиях, так и при воздействии стресс-факторов, но термический стресс (42 °C в течение 2 часов) достоверно увеличивает интенсивность секреции стресс-белков. Среди идентифицированных белков особое значение имеют четыре молекулярных шаперона: GroEl (60 кДа), GroEs (10 кДа), DnaK (75 кДа) и Bfr (17 кДа), выполняющие ключевые функции в системе стресс-ответа бактерий. Комбинированное воздействие окислительного стресса (5 мМ H_2O_2) и повышенной температуры (42 °C) приводило не только к усилению синтеза указанных стресс-белков, но и к появлению дополнительных белковых фракций в электрофореграмме. Максимальная продукция белков в таких условиях наблюдалась при культивировании в среде Мюллера-Хинтона, что и обуславливало нашу дальнейшую работу с этой питательной средой. В отличие от других исследованных сред, при культивировании на Д-бульоне секреция белков *F. tularensis* наблюдалась только при комбинированном стрессовом воздействии (окислительный и температурный стресс), где количество детектируемых белковых фракций не превышало трех.

Для выделения стресс-белков из культуральной жидкости применяли комбинированный стресс (5 мМ H_2O_2 + 42 °С) в течение 2 часов в среде Мюллера-Хинтона под контролем электрооптического анализатора. Для успешного выхода стресс-белков значения АП в процессе стрессирования не должны снижаться ниже 80 ед. Далее из культуральной жидкости, методом осаждения белков сульфатом аммония при различной степени насыщения были получены фракции, содержащие белки Bfr (55 %), GroEl/GroEs (70 %) и HSP (90 %). Для дальнейшей очистки белков проводили гель-фильтрацию на колонке с Сефадексом S-300. Фракции, соответствующие первому пику (Bfr) или второму пику (GroEl/GroEs и HSP), объединяли и концентрировали с использованием центрифужных концентраторов VivaSpin 20 (10 кДа). Очистку белков Bfr и GroEl/GroEs дополнительно проводили методом ионообменной хроматографии на DEAE-Sepharose в 0.05 М Трис-HCl буфере (pH 8.0) с 1 мМ ЭДТА. Оба белка элюировали при концентрации NaCl 300 мМ. Данная методика позволила выделить очищенные антигены *F. tularensis* (Рисунок 2). По данным SDS-PAGE, белковые препараты имеют следующие молекулярные массы: Bfr – 17кДа, GroEl/GroEs – 57/10 кДа. HSP имеет в своем составе 5 мажорных полос с молекулярными массами от 10 до 90 кДа. Согласно проведенному анализу антигены имели разный химический состав (Таблица 2). Полученные данные демонстрируют существенные различия у антигенов по соотношению углеводных и липидных компонентов. Эти результаты могут быть значимы для понимания структурно-функциональных особенностей исследуемых белков.



М – маркеры молекулярной массы 11–250 кДа («Fermentas», США); 1 – GroEl/GroEs; 2 – HSP; 3 – Bfr

Рисунок 2 – Электрофореграмма (SDS-PAGE) секретируемых стресс-белков *F. tularensis* 15 НИИЭГ

Термостабильность белков оценивали методом ИФА после 15-минутного прогрева при различных температурах. Установлено, что все исследуемые антигены сохраняли им-

мунохимическую активность при нагревании до 65 °С, тогда как при 85 °С снижение активности наблюдалось только для белка Bfr.

Таблица 2 – Состав и иммунохимические свойства антигенов *F. tularensis* 15НИИЭГ

Антиген	Химический состав, %			Активность в ИФА, мкг/мл		
	Белки	Углеводы	Липиды	25 °С	65 °С	85 °С
Bfr	97±0,6	3±0,7	0	0,97±0,3	2,3±1,4	15,5±5,8
GroEl/ GroEs	84,4±1,2	15,6±2,2	0	1,97±1,2	2,4±0,4	1,2±0,7
HSP	54±6,4	32,5±4,1	13,5±1,8	1,9±0,4	2,1±1,0	1,8±0,6

В ходе исследований *in vivo* изученные антигены не проявляли токсического действия на лабораторных животных и не вызывали признаков интоксикации. Анализ апоптоза и пролиферации спленоцитов морских свинок показал, что пик пролиферативной активности при введении всех препаратов в среднем приходился на 14-е сутки после иммунизации (Таблица 3). Наиболее продолжительный иммунный ответ индуцировал антиген HSP, демонстрируя к 30-м суткам статистически значимо высокий уровень пролиферативной активности (23,8 ± 0,68 %; $p < 0,05$) и лейкоцитолиза (25,4 %; $p < 0,01$), что свидетельствует о его способности формировать устойчивый иммунный ответ.

Таблица 3 – Влияние антигенов туляремийного микроба на распределение спленоцитов морских свинок по клеточному циклу в процессе иммуногенеза

Препарат	Сроки иммуногенеза, сутки	Апоптотические клетки (M±m), %	Пролиферирующие клетки (M±m), %	Лейкоцитолиз, %
Bfr	7	4,3±0,96	24,4±1,24	10
	14	4,0±0,62	27,3±1,99	42,8
	21	2,5±0,75	24,6±1,46	15,3
	30	2,6±0,07	21,7±0,99	12,5
GroEl/ GroEs	7	5,8±0,64	18,5±0,75	11,4
	14	4,6±0,46	25,1±1,08	23,8
	21	8,2±0,49	12,3±1,24	12,2
	30	6,5±0,88	21,9±0,4	9,6
HSP	7	4,8±0,13	16,9±0,51	9,7
	14	5,0±0,66	18,3±1,26	38,09
	21	3,8±0,09	18,7±1,37	16,8
	30	4,9±0,31	23,8±0,68	25,4
Контроль	–	2,7±0,29	15,4±2,22	12,6

Анализ протективных свойств стресс-белков *F. tularensis* на модели мышей линии BALB/c показал, что однократная иммунизация обеспечивает защиту при подкожном заражении вирулентным штаммом *F. tularensis* subsp. *holarctica* 503/840. Значения ED_{50} со-

ставили: для HSP — 46 мкг, для GroEl/GroEs — 31 мкг, для Bfr — 15,7 мкг. Индекс иммунитета был равен 232, 158 и 72,5 соответственно. При оценке влияния на выживаемость мышей, иммунизированных однократно каждым антигеном (HSP, Bfr, GroEl/GroEs) в дозе 20 мкг, все исследуемые белки показали выраженный защитный эффект. После контрольного заражения на 21-е сутки *F. tularensis* subsp. *holarctica* 503/840 (доза 100 м.к., LD_{50} = 1 м.к.) в группе иммунизированных животных наблюдалась достоверно более высокая выживаемость (свыше 50 % в течение эксперимента), тогда как в контрольной группе регистрировалась 100 % гибель на 6–8-е сутки (Рисунок 3).

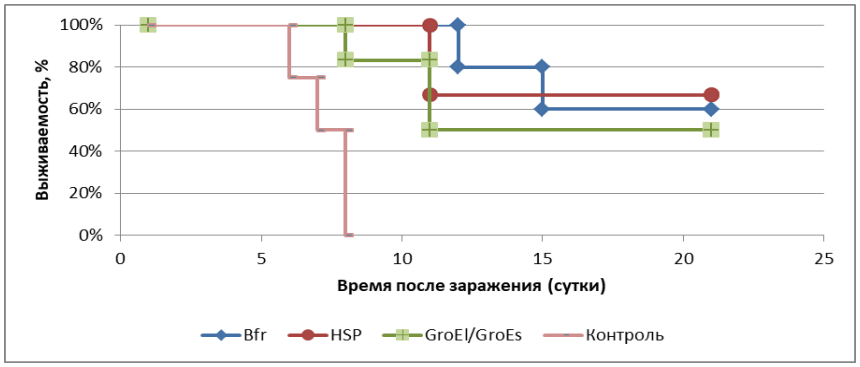
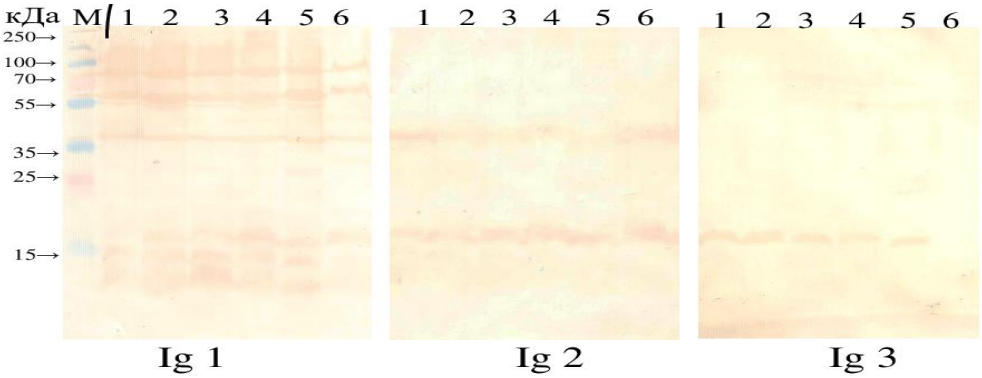


Рисунок 3 – Выживаемость белых мышей, иммунизированных стресс-белками туляремийного микроба, после заражения 100 м.к. вирулентного штамма *F. tularensis* subsp. *holarctica* 503/840

Титр специфических антител к исследуемым стресс-белкам (Bfr, GroEl/GroEs, HSP) в сыворотках крови вакцинированных и переболевших животных определяли методом ИФА с использованием очищенных антигенов вакцинного штамма *F. tularensis* в рабочей концентрации 20 мкг/мл. Данные показали отсутствие антительного ответа к Bfr при вакцинации живой туляремийной вакциной (ЖТВ), что свидетельствует о его низкой доступности в цельноклеточном препарате. В отличие от вакцинации, заражение диким штаммом вызывало достоверное повышение титра антител к Bfr (1/20; $p < 0,05$), указывающее на его экспрессию *in vivo* при инфекции. Для HSP и GroEL/GroES характерен активный антительный ответ во всех группах (1/160 – 1/320, $p < 0,05$). Двукратная иммунизация высокими дозами ЖТВ (10^5–10^6) повышала титры в 2–4 раза (1/320 – 1/640, $p < 0,05$), тогда как низкие дозы (10^2–10^3 м.к.) индуцировали слабый ответ. Ревакцинация и перенесенная инфекция усиливали иммунный ответ, формируя долговременную иммунную память, что связано с пролонгированной экспозицией антигенов. В отличие от инфекции, вакцинные препараты могут вызывать менее интенсивный ответ из-за ограниченного набора антигенов [Murphy K.M. et al., 2017].

Учитывая высокую иммуногенность исследуемых антигенов, их использовали для получения специфических антител. Были разработаны две схемы иммунизации кроликов с применением адъювантов (коллоидное золото, хитозановые частицы) для получения гипериммунных сывороток к каждому из трёх белков. Из сывороток выделены препараты специфических иммуноглобулинов (Ig Bfr, Ig GroEl/GroEs, Ig HSP).

В ИФА все полученные поликлональные антитела проявили высокую специфичность без перекрёстных реакций с представителями родов *Yersinia*, *Vibrio* и *Shigella*. Наибольшей чувствительностью характеризовался Ig Bfr (порог детекции $3{,}12\times10^6$ м.к./мл). Ig HSP и Ig GroEl/GroEs также показали высокую чувствительность ($6{,}25\times10^6$ и $2{,}5\times10^7$ м.к./мл соответственно) и, в отличие от Ig Bfr, детектировали штамм *F. tularensis* subsp. *novicida* Utah 112 (1×10^8 м.к./мл). Методом иммуноблоттинга подтверждена видовая специфичность антител и их способность связываться с иммунодоминантными субъединицами соответствующих антигенов у различных подвидов *F. tularensis* (Рисунок 4).



HSP (Ig 1), GroEl/GroEs (Ig2), Bfr (Ig 3): 1 – *F. tularensis* subsp. *holarctica* 503/840; 2 – *F. tularensis* subsp. *holarctica* КМ-3 (21Л); 3 – *F. tularensis* subsp. *holarctica* биовар *japonica* Kosho; 4– *F. tularensis* subsp. *tularensis* B-399 A-Cole; 5 – *F. tularensis* subsp. *mediasiatica* A-61 (117); 6 – *F. tularensis* subsp. *novicida* Utah 112; M – маркеры молекулярной массы

Рисунок 4 – Результаты иммуноблоттинга лизатов *F. tularensis* разных подвидов с поликлональными антителами к стресс-белкам туляремийного микроба

4. Комплексный методический подход к изучению функционального состояния *F. tularensis* и прикладные аспекты его использования

Получение секретируемых антигенов *F. tularensis* в препаративных количествах требует комплексного подхода для контроля ключевых параметров. Разработанная методика включает мониторинг жизнеспособности клеток электрооптическим анализом и оценку активности антигенов методами ИФА и ДОТ-ИФА. На основе данных ПЦР-анализа о связи уровня экспрессии генов со стресс-воздействием возможно регулировать

условия культивирования для целенаправленной индукции синтеза целевых антигенов. Данный подход особенно эффективен при работе *in vivo* и в условиях ограниченности альтернативных методов оценки.

Исследовано комбинированное воздействие температурного (42 °C) и окислительного (5 мМ H_2O_2) стресса, имитирующего условия внутри макрофага. ЭО-анализ выявил универсальную для всех изученных штаммов реакцию — снижение АП на частоте 2100 кГц на 25–36 %, свидетельствующее о нарушении метаболизма и целостности мембраны. Динамика АП на частоте 900 кГц оказалась разнонаправленной: увеличение у авирулентных штаммов (15 НИИЭГ, КМ-9, Utah 112) и снижение у вирулентных (503/840, B399 A-Cole), что коррелирует с их патогенным потенциалом (Таблица 4). Обнаружена сильная корреляция (r_s = 0.89) между электропроводностью цитоплазмы и размером клетки. По данным ПЦР-анализа, экспрессия всех исследуемых генов была в среднем в 2 раза выше по сравнению с контролем. Выявлена сильная корреляционная связь (r_s = 0,9) между генами *groEl* и *bfr*. Методом ИФА показано, что вирулентные штаммы в меньшей степени секретируют белки во внешнюю среду по сравнению с авирулентными, для которых характерна активная секреция.

Таблица 4 – Динамика изменений АП при частоте ориентирующего поля 900 кГц и 2100 кГц, размеров клеток до (I) и после (II) перекисного и температурного стресса

Штамм	Условия	$АП_{900}$, усл. ед.	$АП_{2100}$, усл. ед.	Размер, мкм	Жизнеспособность, %
F. tularensis subsp. *holarctica* 15 НИИЭГ	I	84,26	87,43	1,671	100
	II	99,43 (+18,0 %)	31,65 (-36,2 %)	1,761 (+5,1 %)	74
F. tularensis subsp. *holarctica* КМ-9 (Cap^-)	I	80,46	93,13	1,773	100
	II	102,73 (+21,7 %)	34,85 (-62,6 %)	1,99 (+10,9 %)	74
F. tularensis subsp. *novicida* Utah 112	I	106,67	102,78	1,041	100
	II	134,23 (+25,84 %)	66,03 (-35,75 %)	1,084 (+3,97 %)	69
F. tularensis subsp. *holarctica* 503/840	I	136,26	122,75	1,043	100
	II	119,39 (-12,38 %)	78,69 (-35,9 %)	1,031 (-1,15 %)	81
F. tularensis subsp. *tularensis* B399 A-Cole	I	128,15	104,01	1,051	100
	II	102,92 (-19,68 %)	78,24 (-24,77 %)	1,031 (-1,9 %)	77

Исследована экспрессия стресс-генов (*bfr, groEl, rpoH*) *F. tularensis* на первичных линиях макрофагов и лимфоцитов. Для всех исследуемых штаммов характерна стабильная экспрессия гена *groEl*, подчеркивающая его центральную роль в клеточном гомеостазе и

критическую роль в выживании внутри клетки-хозяина. К 6-му часу у вирулентных штаммов наблюдалось резкое снижение экспрессии *rpoH* и *bfr* с последующей активацией бактериального роста, что свидетельствует о переходе от стресс-адаптации к репликации. Напротив, у штаммов со стабильной экспрессией этих генов к 24-му часу уменьшалось количество клеток, что может указывать на их неспособность адаптироваться к изменяющимся условиям внутриклеточной среды.

В условиях роста антимикробной резистентности исследование механизмов устойчивости *F. tularensis* имеет особую актуальность. Несмотря на редкую резистентность клинических изолятов, возбудитель обладает значительным эволюционным потенциалом для её развития. При оценке воздействия антибиотиков основных классов (β-лактамы, макролиды, хинолоны, аминогликозиды) на вакцинный штамм *F. tularensis* 15 НИИЭГ электрооптический анализ выявил дозозависимый характер их влияния на бактериальные клетки. Молекулярные исследования показали, что все антибиотики индуцируют экспрессию генов стресс-ответа (*bfr, groEl, rpoH*), но с различной активностью, зависящей от механизма их действия. ОТ-ПЦР выявил избирательную активацию исследуемых генов: ингибиторы трансляции (стрептомицин, хлорамфеникол) сильно активировали *groEl* (в 10–16 раз для вакцинного штамма), а ингибитор репликации ДНК (налидиксовая кислота) активировал *rpoH* (в 2 раза). Важно, что вирулентные штаммы демонстрировали значительно менее выраженный стресс-ответ (до 3-кратного увеличения экспрессии) по сравнению с аттенуированным вакцинным штаммом (до 16-кратного), что указывает на более строгий контроль стрессовых реакций у патогенных изолятов.

Иммуноферментный анализ выявил, что наибольшую секрецию стресс-белков (HSP, GroEl/GroEs) в культуральную жидкость вызывала налидиксовая кислота. Подавление синтеза всех стресс-белков под действием ингибиторов трансляции (эритромицин, хлорамфеникол) указывает на ограничения ИФА для оценки стресс-ответа при использовании антибиотиков, нарушающих белковый синтез.

Проведена сравнительная оценка методов хранения вакцинного штамма *F. tularensis*: лиофилизации, криоконсервации и регулярных пересевов. Установлено, что пересевы обеспечивают максимальную жизнеспособность и стабильность электрооптических показателей. Однако именно при этом методе наблюдается наибольшее снижение показателя «остаточная вирулентность» (значение LD_{50} увеличилось с 10^2 до 10^6 м.к. за 3 года) и накопление единичных мутаций в генах, связанных с репликацией ДНК и стресс-ответом. В отличие от этого, лиофилизация и криоконсервация, несмотря на вызываемые клеточные повреждения, сохраняют регламентированный уровень остаточной вирулентности и генетическую стабильность штамма. Методами ПЦР и ИФА выявлена активация

стресс-ответа (повышение экспрессии *rpoH* в 2–4 раза и накопление белка HSP) при длительном хранении, наиболее выраженная в условиях периодических пересевов и лиофилизации. Таким образом, оптимальным методом хранения рабочей культуры вакцинного штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ в течение длительного времени (до 2-х лет) без изменения его свойств является криоконсервация.

Комплексный методический подход позволяет провести всестороннюю оценку влияния стресс-факторов (температурный и окислительный стресс, воздействие антибиотиков, длительное хранение) на функциональное состояние клеток *F. tularensis* и углубляет понимание механизмов их взаимодействия с клетками макроорганизма.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Возбудитель туляремии *F. tularensis* демонстрирует исключительную экологическую пластичность, способность колонизировать разнообразные экологические ниши и адаптироваться к различным стрессовым факторам. В данном исследовании был применен комплексный методический подход, включающий молекулярно-генетические (ОТ-ПЦР, цифровая капельная ПЦР), биофизические (электрооптический анализ) и иммунохимические (ИФА, иммуноблоттинг) методы, что позволяет всесторонне охарактеризовать стресс-ответ патогена.

Ключевым достижением стала разработка высокоспецифичных систем для детекции экспрессии генов стресс-ответа (*groEl, bfr, rpoH*), что открывает возможности для мониторинга физиологического состояния бактерий. Установлено, что вирулентные штаммы демонстрируют более сдержанный стресс-ответ и сниженную секрецию белков, что коррелирует с их стратегией скрытого внутриклеточного паразитирования. В условиях комбинированного стрессового воздействия (42 °C + 5 мМ H_2O_2) получены три секретируемых стресс-белка: Bfr (17 кДа), GroEl/GroEs (57 кДа /10 кДа) и комплекс HSP (5 мажорных полос, 10–90 кДа). Все препараты проявили термостабильность (сохранение активности до 85 °C, за исключением термолабильности Bfr), отсутствие токсичности, выраженную иммуногенность и протективную эффективность при экспериментальной туляремии.

На основе полученных антигенов разработаны схемы иммунизации и получены поликлональные антитела (Ig Bfr, Ig HSP, Ig GroEl/GroEs), специфичные к различным подвидам *F. tularensis* и не дающие перекрестных реакций с гетерологичными микроорганизмами.

Разработан и апробирован комплексный методический подход для мониторинга функционального состояния *F. tularensis*, позволяющий оценивать физиологические, молекулярно-генетические и иммунохимические параметры бактериальной клетки. Установлено, что реакция на стресс носит штамм-специфический характер и определяется виру-

лентностью штамма. Показано, что электрооптический анализ, ПЦР в режиме реального времени и ИФА могут взаимодополнять друг друга при оценке стресс-ответа. Полученные данные имеют практическую значимость для оптимизации культивирования, направленной индукции синтеза целевых антигенов и выбора оптимальных методов хранения вакцинного штамма, обеспечивающих генетическую стабильность и регламентированный уровень остаточной вирулентности.

Практическая значимость работы подтверждается разработкой методических рекомендаций и способа получения стресс-белков. Результаты исследования создают основу для разработки новых поколений диагностических тест-систем, средств контроля качества вакцинных штаммов и перспективных субъединичных вакцинных препаратов против туляремии.

ВЫВОДЫ

1. Разработан способ определения уровня экспрессии генов стресс-белков (*groEl, bfr, rpoH*) молекулярно-генетическими методами (ОТ-ПЦР и цкПЦР), позволяющий количественно оценивать экспрессию генов у разных подвидов *F. tularensis* в ответ на стрессовые воздействия. Подобраны специфичные праймеры и зонды к участкам генов-регуляторов стресс-ответа (*bfr, groEl, rpoH*), доказана их чувствительность, позволяющая выявлять кДНК туляремийного микроба (до 10^4 м.к./мл для ОТ-ПЦР и 10^1 м.к./мл для цкПЦР), и специфичность (отсутствие взаимодействия с гетерологичными микроорганизмами).

2. Полученные экспериментальные данные подтверждают возможность использования электрооптического анализа для оценки жизнеспособности клеток *F. tularensis* при стрессовом воздействии и демонстрируют наличие сильной статистически значимой корреляции ($r_S \approx 0,9$; $p < 0,05$) показателя анизотропии поляризуемости (АП) с долей жизнеспособных клеток, что определяет потенциал метода для контроля состояния бактериальной культуры в режиме реального времени.

3. Установлено, что стресс-белки *F. tularensis* (HSP, GroEl/GroEs, Bfr) не проявляют токсичности *in vivo* и индуцируют пролиферацию иммунокомпетентных клеток. Доказана эффективность однократной иммунизации данными антигенами мышей линии BALB/c против подкожного заражения вирулентным штаммом *F. tularensis* subsp. *holarctica* 503/840: значения индекса иммунитета для HSP, GroEl/GroEs и Bfr составили 232, 158 и 72,5, соответственно.

4. Применение стресс-белков (GroEl/GroEs, HSP) в ИФА (в качестве сенситинов) и в иммуноблоттинге (в качестве маркерных антигенов) позволило детектировать специфические антитела в сыворотках крови вакцинированных и переболевших

животных. Наибольшей иммунореактивностью в серологических тестах характеризовался комплекс GroEl/GroEs.

5. Разработана схема иммунизации кроликов-продуцентов с использованием исследуемых антигенов в комплексе с адъювантами (коллоидное золото и хитозановые частицы), позволившая получить специфические антисыворотки с минимальным уровнем гетерологичных антител. На основе этих поликлональных антител созданы экспериментальные иммуноферментные диагностические системы (ИФА и иммуноблоттинг), демонстрирующие чувствительность в детекции всех подвидов возбудителя туляремии (до $3{,}12\times10^6$ м.к./мл) и не проявляющие перекрестной реактивности с гетерологичными бактериями.

6. Показано, что температурный стресс, перекисное окисление, антибиотики и взаимодействие с иммунными клетками хозяина активировали гены *groEl* и *bfr*, при этом экспрессия *rpoH* варьировала в зависимости от штамма туляремийного микроба. У вирулентных штаммов наблюдалось снижение показателя анизотропии поляризуемости на частоте 900 кГц и меньший выход стресс-белков в культуральную жидкость, в среднем, в два раза. Разработанный комплексный методический подход, включающий биофизический, иммунохимический и молекулярно-генетический методы анализа, позволил охарактеризовать стресс-ответ *F. tularensis*.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИИСЕРТАЦИИ

Экспериментальные статьи:

1. Кузнецова, Е.М. Комплексный методический подход для выделения иммунобиологически активных антигенных компонентов внешних мембран туляремийного микроба / Е. М. Кузнецова, **С.В. Борисова**, О. А. Волох, А. К. Никифоров // **Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова**. – 2019. – Т. 15, № 4. – С. 41-49. (из «Перечня ВАК…»)

2. **Борисова, С.В.** Применение нового инструментального метода для оценки функционального состояния клеток *Francisella tularensis* в стрессовых условиях/ **С.В. Борисова**, Е.М. Кузнецова, П.С. Ерохин, О.А. Волох// Известия Саратовского университета. Новая серия. Серия: Химия. Биология. Экология. – 2019. – Т. 19, № 3. – С. 326-330. – DOI 10.18500/1816-9775-2019-19-3-326-330.

3. Волох, О.А. Электрооптический анализ жизнеспособности клеток вакцинного штамма туляремийного микроба / О. А. Волох, **С.В. Борисова**, Д. Н. Бибиков [и др.] // **Проблемы особо опасных инфекций**. – 2020. – № 3. – С. 50-55. – DOI 10.21055/0370-1069-2020-3-50-55. (из «Перечня ВАК…»)

4. **Борисова, С.В.** Оценка иммунобиологических свойств стресс-белков туляремийного микроба / **С.В. Борисова**, О.А. Волох, А.Л. Кравцов, В.А. Кожевников// Национальные приоритеты России. – 2021. – № 3(42). – С. 116-119.

5. **Борисова, С.В.** Детерминанты устойчивости *Francisella tularensis* к стрессовым условиям окружающей среды / **С.В. Борисова**, О.А. Волох // **Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии**. – 2022. – Т. 99, № 3. – С. 362-371. – DOI 10.36233/0372-9311-219. (из «Перечня ВАК…»)

6. **Борисова, С.В.** Динамика показателей иммунитета биомоделей, иммунизированных стресс-белками *Francisella tularensis* / **С.В. Борисова**, О.А. Волох, В.А. Кожевников [и др.] // **Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова**. – 2023. – Т. 19, № 3. – С. 6-13. (из «Перечня ВАК…»)

7. **Борисова, С.В**. Современные способы оценки влияния внешних факторов на физиологическое состояние бактериальной клетки / С.В. Борисова, О.А. Волох, Л.В. Коломбет, Р.Р. Салихов // **Бактериология**. – 2024. – Т. 9, № 2. – С. 50-57. – DOI 10.20953/2500-1027-2024-2-50-57. (из «Перечня ВАК…»)

8. Киреев, М.Н. Биотехнологический потенциал антигенов возбудителей чумы, холеры, туляремии и сибирской язвы, полученных в институте "Микроб" / М.Н. Киреев, О.В. Громова, **С.В. Борисова** [и др.] // **Проблемы особо опасных инфекций**. – 2024. – № 2. – С. 15-19. – DOI 10.21055/0370-1069-2024-2-15-1. (из «Перечня ВАК…»)

9. Кузнецова, Е.М. Оценка диагностической значимости кроличьих поликлональных антител к комплексным антигенам внешних мембран и секретируемым стресс-белкам *Francisella tularensis* / Е.М. Кузнецова, **С.В. Борисова**, О.А. Волох, В.Г. Германчук, А.К. Никифоров // **Проблемы особо опасных инфекций**. – 2025. – № 2. – С. 116-122. – DOI 10.21055/0370-1069-2025-2-116-122. (из «Перечня ВАК…»)

Патенты и базы данных:

10. **Борисова С.В.** Пат. 2830065 РФ, МПК C12P 21/00. Способ получения секретируемых стресс-белков *Francisella tularensis* / **С.В. Борисова**, О.А. Волох, М.Н. Киреев, Е.М. Кузнецова. Опубл. 12.11.2024 г. Бюл. №32.

11. Салихов Р.Р. База данных 2023622431 РФ. Система протоколирования и анализа результатов процесса аппаратного глубинного культивирования бактерий / Р.Р. Салихов, О.А. Волох, Е.М. Кузнецова, **С.В. Борисова**, В.Р. Вольников, Н.Г. Авдеева, Ю.И. Самохвалова, А.К. Никифоров. Опубл. 17.07.2023 г. Бюл. №7.

12. Салихов Р.Р. База данных 2025622621 РФ. Биотехнологически значимые антигены возбудителей особо опасных инфекций / Р.Р. Салихов, О.А. Волох, С.В. Генералов, С.А. Воробьева, **С.В. Борисова**, Е.М. Кузнецова, О.В. Громова, С.П. Заднова, О.М. Кудрявцева, А.Ю. Гончарова, М.Н. Киреев. Опубл. 18.06.2025 г. Бюл. №6.

Публикации в сборниках научных и научно-практических конференций:

13. **Борисова С.В.** Влияние времени замораживания на качество лиофилизатов живой туляремийной вакцины/ **С.В. Борисова**, Д.Н. Бибиков, А.В. Комиссаров, О.А. Волох, С.А. Бадарин, Н.В. Синицына, Н.И. Костылева, А.К. Никифоров // Сборник тезисов V Международной конференции молодых ученых: биотехнологов, молекулярных биологов и вирусологов: Сборник тезисов, Кольцово, 23–25 октября 2018 года. – Кольцово: Автономная некоммерческая организация “Инновационный центр Кольцово”, 2018. – С. 26-28.

14. **Борисова С.В.** Применение новых инструментальных методов контроля на этапах получения лиофилизата вакцинного штамма *Francisella tularensis* 15 НИИЭГ/ **С.В. Борисова**, Д.Н. Бибиков, О.А. Волох, Д.В. Уткин, Е.М. Кузнецова, А.В. Комиссаров // Современные проблемы биофизики, генетики, электроники и приборостроения: Материалы IV Всероссийского семинара памяти профессора Ю.П. Волкова, Саратов, 24–25 мая 2018 года. – Саратов: Издательство "Саратовский источник", 2018. – С. 18-21.

15. **Борисова С.В.** Оптимизация условий получения белков теплового шока у туляремийного микроба/ **С.В. Борисова**, Е.М. Кузнецова, О.А. Волох// Современные проблемы эпидемиологии, микробиологии и гигиены: Материалы XII Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых и специалистов Роспотребнадзора, Ростов-на-Дону, 21–22 октября 2020 года/ Под редакцией А.Ю. Поповой, А.К. Носкова. – Ростов-на-Дону: Общество с ограниченной ответственностью "Мини Тайп", 2020. – С. 291-293.

16. **Борисова С.В.** Применяемые и перспективные методы контроля физиологического состояния микроорганизмов в биотехнологических процессах/ **С.В. Борисова**, А.В. Комиссаров, О.А. Волох, Д.Н. Бибиков, А.К. Никифоров // Зыкинские чтения: Материалы Национальной научно-практической конференции, посвященной памяти доктора меди-

цинских наук, профессора Леонида Федоровича Зыкина, Саратов, 28 апреля 2021 года. – Саратов: ООО «ЦеСАин», 2021. – С. 44-49.

17. **Борисова С.В**. Разработка методического подхода для оценки влияния неблагоприятных воздействий и изменений условий роста на физиологическое состояние клеток туляремийного микроба / **С.В. Борисова**, Р.Р. Салихов, О.А. Волох// Эпидемиологический надзор за актуальными инфекциями: новые угрозы и вызовы: Сборник научных трудов Всероссийской научно-практической конференции с международным участием, посвященной 100-летию академика И.Н. Блохиной, Нижний Новгород, 26–27 апреля 2021 года / Под редакцией Н.Н. Зайцевой. – Нижний Новгород: Медиаль, 2021. – С. 264-266.

18. Борисова, С.В. Разработка способа детекции генов стресс-белков *Francisella tularensis*/ **С.В. Борисова**, И.В. Тучков, О.А. Волох// Молекулярная диагностика и биобезопасность-2022: Сборник материалов конгресса с международным участием, Москва, 27–28 апреля 2022 года. – Москва: ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, 2022. – С. 231.

19. **Борисова С.В.** Использование современных методов для оценки устойчивости *Francisella tularensis* к стресс-факторам/ **С.В. Борисова**, О.А. Волох// Plamic2024: Материалы IV Международной научной конференции «Растения и микроорганизмы: биотехнология будущего» и III Всероссийской конференции с международным участием «Механизмы адаптации микроорганизмов к различным условиям среды обитания», Байкальск, 15–22 сентября 2024 года. – Иркутск: Издательство ИГУ, 2024. – С. 396-398.

20. **Борисова С.В.** Прикладной потенциал экскретируемых антигенов туляремийного микроба/ **С.В. Борисова**, Е.М. Кузнецова, О.А. Волох// Актуальные проблемы болезней, общих для человека и животных: материалы V Всероссийской научно-практической конференции с международным участием, Ставрополь, 24–25 апреля 2024 года. – Ставрополь: ООО "Экспо-Медиа", 2024. – С. 280-281.