

стоит из сплошного слоя эндотелиоцитов, лежащего на тончайшей эластической мембране. Средний слой лимфангионов состоит из двух-трех слоев миоцитов, которые ориентированы продольно, поперечно и спирально. Наружный слой лимфангионов содержит в своем составе коллагеновые и эластические волокна.

Отмечено, что количество миоцитов лимфангионов данных органов положительно коррелирует с возрастом животного и порядковостью сосудов. Наибольшее количество миоцитов (на единицу площади) обнаружено в стенке эфферентных лимфатических сосудов ободочной кишки, затем (в порядке убывания) – сычуга, книжки, сетки и глотки. Меньше всего миоцитов содержат внутриорганные сосуды глотки. Обнаружено, что в интраорганных лимфангионах всех органов миоциты ориентируются преимущественно по типу «пологой спирали» (под углом менее 45 градусов к его продольной оси), а в экстраорганных – по типу «крутой спирали» (угол более 45 градусов).

Коллагеновые и эластические волокна в лимфангионах данных органов формируют пучки с «запасными складками», сплетающиеся в сети. Количество соединительнотканых волокон в лимфангионах данных органов зависит от возраста животного и порядковости сосуда. Чем старше животное и чем выше порядок сосуда, тем более развиты в их лимфангионах коллагеновые и эластические волокна.

Таким образом нами установлены возрастные и локальные особенности лимфангионов глотки, сетки, книжки, сычуга и ободочной кишки овец красной тонкорунной породы.

#### Биологические свойства *msbB* мутантов *Y. pestis*

Шайхутдинова Р.З., Мокриевич А.Н., Дентовская С.В., Анисимов А.П.

ГНЦ прикладной микробиологии, Оболensk

Липоолигосахарид (ЛОС – липополисахарид (ЛПС) R-типа, лишенный O-полисахаридных цепей) – один из важнейших факторов патогенности *Y. pestis*. Активным центром ЛОС является липид А, с которым связывают токсические свойства молекул ЛПС (Luderitz *et al.*, 1973). Гидрофобная часть липида А состоит из двух b-1,6-связанных остатков D-глюкозамина, ацилированных жирными кислотами по гидроксильным и аминокетильным группам. Жирнокислотные остатки первого порядка также могут быть ацилированы по гидроксильным группам. Структура ЛПС (ЛОС), в частности, строение липида А определяется условиями среды, окружающей микроорганизм во время его роста (Книрель, Кочетков, 1993). Показано, что повышение температуры культивирования приводит к уменьшению количества жирных кислот в липиде А *Y. pestis* (Kawahara *et al.*, 2002; Knirel *et al.*, 2003). Вместе с тем, показано, что ЛОС штаммов *Y. pestis*, выращенных при температуре 28 °С более токсичны для мышей, чем ЛОС штаммов *Y. pestis*, выращенных при температуре 37 °С (Зюзина и др., 2002).

Генетические аспекты синтеза ЛПС наиболее полно изучены на моделях *Escherichia coli* и *Salmonella typhimurium*. Установлены кластеры генов, опре-

деляющие биосинтез липида А, кора и O-антигена. Одним из этапов синтеза липида А является процесс ацилирования, в котором участвует целый ряд ацилтрансфераз. Ацилтрансфераза *MsbB* отвечает за присоединение шестого жирнокислотного остатка к пентаацильным вариантам ЛПС (ЛОС) (Raetz, Whitfield, 2002). Мутация по гену *msbB* в клетках *E. coli* и сальмонелл приводила к снижению их вирулентности (токсичности) на три-четыре порядка (Raetz, Whitfield, 2002).

Целью исследования было получение штаммов *Y. pestis*, мутантных по *msbB* гену и изучение их биологических свойств.

На основе суицидного вектора pCVD442 (Donnenberg, M.S. and Kapur, J.B., 1991) создали рекомбинантную плазмиду pMSB3K, содержащую в своем составе фрагмент хромосомной ДНК *Y. pestis* KM215 с *msbB* геном, в котором 0,66 kb участок структурного гена был замещен 1,264 kb *Bam*HI-фрагментом из плазмиды pUC4K, обеспечивающим устойчивость к канамицину. Полученная плазида передана методом электропорации в штамм *E. coli* S17, который обладает *tra* геном, необходимым для эффективной конъюгативной передачи плазмид, содержащих *mob* ген. Далее методом конъюгации плазида pMSB3K передана в ряд реципиентных штаммов *Y. pestis*. Из трансконъюгантов при выращивании в условиях, приводящих к потере суицидного вектора, отобраны мутанты, образующиеся в результате гомологичной рекомбинации участка хромосомы, содержащей интактный *msbB* ген с его мутантной аллелью в суицидном векторе. Наличие мутации подтверждено методом ПЦР.

Полученные мутанты практически не росли на агаре Хоттингера, в присутствии канамицина. Выращивание на той же среде без хлорида натрия в присутствии канамицина или на агаре Хоттингера без канамицина приводило к более эффективному росту. Скорость миграции ЛОС, выделенного из мутантных штаммов, при электрофоретическом разделении была выше, чем у ЛОС из штаммов "дикого" типа, что подтверждает меньшую степень ацилирования молекул ЛОС из рекомбинантных штаммов. Чувствительность мутантов к катионному антибиотику-полимиксину по сравнению с исходными штаммами, была более чем на два порядка выше. Мутантные клетки и препараты ЛОС, выделенные из них, были в 4-10 раз менее токсичны для мышей, сенсibilизированных актиномицином D.

Работа выполнена в рамках партнерского проекта Международного научно-технического центра (ISTC) #1197p, поддержанного программой Cooperative Threat Reduction Департамента Оборона США.