УДК 616.98:579.842.23

Г.В.Демидова, В.П.Зюзина, Е.П.Соколова, Н.И.Пасюкова, И.А.Беспалова, Т.Н.Бородина, В.И.Тынянова

ТОКСИЧНОСТЬ РАЗЛИЧНЫХ ФОРМ ЛИПОПОЛИСАХАРИДОВ YERSINIA PESTIS ДЛЯ БЕЛЫХ МЫШЕЙ, СЕНСИБИЛИЗИРОВАННЫХ D-ГАЛАКТОЗАМИНОМ

ФКУЗ «Ростовский-на-Дону научно-исследовательский противочумный институт», Ростов-на-Дону, Российская Федерация

Определена токсичность высокотемпературных ЛПС37 и комплексов ЛПС с мышиным токсином (ЛПС37-МТ) вакцинного и вирулентного штаммов Yersinia pestis для белых мышей, сенсибилизированных D-галактозамином (D-GalN). LD_{50} ЛПС37 и ЛПС37-МТ Y. pestis 231 для интактных мышей составляла соответственно 310÷500 и 110÷250 мкг/мышь. ЛПС37 Y. pestis EV76 нетоксичен для биопробных животных в дозе 3 мг. В то же время ЛПС37-МТ токсически активен и его LD_{50} равна 520÷610 мкг/мышь. На фоне D-GalN чувствительность животных к действию указанных форм ЛПС вакцинного штамма повышалась на два порядка, а для ЛПС вирулентного штамма — на три. При этом различия токсических свойств между исходными (ЛПС37) и конформационно измененными (ЛПС37-МТ) формами ЛПС обоих исследованных штаммов Y. pestis полностью нивелируются.

Ключевые слова: Yersinia pestis, эндотоксиновая толерантность, липополисахарид (ЛПС), комплекс ЛПС с мышиным токсином (МТ), D-галактозамином (D-GalN).

G.V.Demidova, V.P.Zyuzina, E.P.Sokolova, N.I.Pasyukova, I.A.Bespalova, T.N.Borodina, V.I.Tynyanova Toxicity of Various Forms of *Yersinia pestis* Lipopolysaccharides to D-Galactosamine Sensitized White Mice

Rostov-on-Don Research Anti-Plague Institute, Rostov-on-Don, Russian Federation

Determined has been toxicity to D-galactosamine (D-GalN) sensitized white mice of high-temperature LPS37 and LPS complexes with murine toxin (LPS37-MT) contained in vaccine and virulent *Yersinia pestis* strains. *Y. pestis* 231 LPS37 and LPS37-MT LD $_{50}$ for intact mice is $310\div500$ and $110\div250$ mcg/mouse, respectively. *Y. pestis* EV76 LPS37 is non-toxic for experimental animals if administered in a dose of 3 mcg. While *Y. pestis* EV76 LPS37-MT is toxically active and its LD $_{50}$ equals $520\div610$ mcg/mouse. Sensitivity of the animals to the stated above LPS forms' effect when affected by D-GalN is by two orders greater, and as for LPS of the virulent strain is by three orders. Concurrently, differences in toxicity properties in the original (LPS37) and conformationally altered (LPS37-MT) LPS-forms in both of the tested *Y. pestis* strains drop out of the equation completely.

Key words: Yersinia pestis, endotoxin resistance, lipopolysaccharide (LPS), LPS-complex with murine toxin (MT), D-galactosamine (D-GalN).

В настоящее время известно, что токсические свойства бактериальных липополисахаридов (ЛПС) можно усиливать в условиях *in vivo* посредством снижения порога чувствительности макроорганизма к действию ЛПС. С этой целью обычно используют вещества, обладающие иммуносупрессивным действием. Иной способ, широко применяемый в лабораторной практике, заключается в обработке животных аминосахаром D-галактозамином (D-GalN). Сенсибилизация животных этим веществом увеличивает токсичность бактериальных ЛПС в сотни и тысячи раз [5]. Возможность применения D-GalN для повышения токсичности ЛПС чумного микроба на модели белых мышей описана нами ранее [1].

ЛПС Yersinia pestis относится к R-хемотипу. Биологическое своеобразие его заключается в высокой внутривидовой вариабельности химической структуры и температурозависимом характере синтеза ЛПС. В соответствии с химическим строением полимеров токсичность препаратов ЛПС возбудителя чумы весьма различна и колеблется от средних значений LD₅₀

(350–800 мкг/мышь), что характерно для R-ЛПС, до полного отсутствия эффекта токсичности. Как правило, низкотемпературные ЛПС (ЛПС28) чумного микроба токсичны для биопробных животных, в то время как высокотемпературные ЛПС (ЛПС37) являются слабыми индукторами синтеза провоспалительных цитокинов, а в некоторых случаях вообще не обладают токсическими свойствами [3].

Известно, что в условиях *in vitro* токсичность препаратов ЛПС *Y. pestis* можно усилить путем формирования токсически активной конформации полимеров. Модулятором конформационных изменений ЛПС является специфический белок чумного микроба — мышиный токсин (МТ), который образует комплекс ЛПС-МТ, специфичный и высокотоксичный для биопробных животных [2].

Представляло интерес сравнить токсические свойства исходных и конформационно измененных форм ЛПС вакцинного и вирулентного штаммов чумного микроба для белых мышей, сенсибилизированных D-GalN.

В работе использовали высокотемпературные ЛПС, полученные из клеток вакцинного (EV76) и вирулентного (231) штаммов Y. pestis. Культуры выращивали при 37 °C на агаре LB (Difco, США) в течение 48 ч. ЛПС выделяли фенольным методом.

Мышиный токсин выделяли по оригинальной методике В.И.Марченкова из вакцинного штамма Y. pestis EV76. LD₅₀ препарата МТ равнялась 5,6 (4,0÷7,9) мкг/мышь. Для активации токсических свойств ЛПС Y. pestis препараты ЛПС соединяли с МТ и инкубировали 30 мин при 37 °C с целью образования комплекса ЛПС-МТ [2].

Обработку белых мышей D-GalN проводили по методу C.Galanos et al. в нашей модификации [1]. Максимальная концентрация D-GalN (Merck, Германия) составляла 30 мг на белую мышь. Доза не была токсичной для лабораторных животных. D-GalN растворяли в физиологическом растворе и вводили внутрибрюшинно экспериментальным животным одновременно с препаратами ЛПС Y. pestis, исследуемыми на токсичность. Значение $\mathrm{LD}_{\underline{s_0}}$ рассчитывали по общепринятой формуле Кербера. Статистическую обработку полученных результатов проводили по критерию знаков для вероятности 0,95.

Использованные в работе 37 °C ЛПС вакцинного и вирулентного штаммов чумного микроба существенно различаются по химическому строению [6] и, как показал эксперимент, проявляют различную токсичность для биопробных животных. Так, препарат ЛПС37 вирулентного штамма Y. pestis 231 имеет достаточно высокий уровень токсичности, его LD₅₀ равна 310÷500 мкг/мышь. В то же время ЛПС37 вакцинного штамма Y. pestis EV76 не токсичен для белых мышей в дозах более 3 мг.

При образовании комплекса ЛПС37-МТ токсические свойства ЛПС37 вирулентного штамма увеличиваются приблизительно в 2,5 раза (LD_{50} = 110÷250 мкг/мышь). У вакцинного же штамма, в отличие от нетоксичной исходной формы ЛПС37, конформационно измененный комплекс ЛПС37-МТ токсичен и его LD₅₀ равна 520÷610 мкг/мышь.

Сенсибилизация белых мышей D-GalN способствует повышению чувствительности животных к действию всех указанных форм ЛПС чумного микроба. При этом выяснилось, что на фоне D-GalN различия в летальной токсичности исходных и конформационно измененных форм ЛПС как вакцинного, так и вирулентного штаммов Y. pestis полностью нивелируются. Доза ЛПС, вызывающая 100 % гибель животных, для препаратов всех форм (ЛПС37 и ЛПС37-МТ обоих штаммов) одинакова и равна 10 мкг/мышь. В то же время минимальные дозы препаратов ЛПС37 и ЛПС37-МТ, при которых наблюдается гибель 10-30 % животных, различны для вакцинного и вирулентного штаммов Y. pestis. Для препаратов ЛПС Y. pestis EV76 она равна 5 мкг/мышь, а для препаратов ЛПС вирулентного штамма Y. pestis 231 составляет 0,1 мкг/мышь. Таким образом, D-GalN усиливает токсичность ЛПС37 и ЛПС37-МТ вирулентного штамма Y. pestis 231 в 100-1000 раз, а ЛПС37-МТ вакцинного штамма Y. pestis EV76 в 100 раз. Нетоксичный в обычных условиях ЛПС37 Y. pestis EV76 на фоне D-GalN проявляет такую же токсичность, как и конформационно измененная форма ЛПС37-МТ.

По данным литературы известно, что действие аминосахара D-GalN на организм млекопитающих избирательно и направлено исключительно на клетки печени [5]. В паренхиме печени специфические рецепторы для ЛПС (TLR2/TLR4) экспрессируют только звездчатые ретикулоэндотелиоциты Купферовы клетки. Связывание ЛПС с Toll-рецепторами приводит к передаче трансмембранного сигнала, направленного на активацию главного регулятора синтеза провоспалительных цитокинов - фактора ядерной транскрипции (NFkb). Синтез TNF-α, инициированный ЛПС, может ограничиваться только Купферовыми клетками, или может быть усилен путем передачи сигнала от TNF-а (уже синтезированного) на соответствующие рецепторы цитокинактивных клеток печени (нормальные киллеры и Т-лимфоциты). В свою очередь передача сигнала от TNF-α реализуется через два типа трансмембранных рецепторов, которые присутствуют на всех ядерных клетках организма млекопитающих – TNFR и FasR. Взаимодействие TNF-α с внутриклеточными адапторными белками FasR инициирует апоптоз клетки, а с TNFR активирует NFkb, запуская тем самым вторичный цикл синтеза TNF-α [4].

Результаты проведенных исследований свидетельствуют о том, что на фоне D-GalN исходные и конформационно измененные формы ЛПС чумного микроба, независимо от их исходной токсичности, в условиях макроорганизма обладают приблизительно одинаковой TNF-α индуцирующей активностью. Видимо, в присутствии D-GalN ЛПС каскадно активирует всю сеть цитокининдуцирующих клеток печени, при этом путь передачи сигнала от TNF-α на Fas-рецепторы является доминантным, что приводит к апоптозу гепатоцитов и гибели макроорганизма.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Демидова Г.В., Зюзина В.П., Соколова Е.П., Бородина Т.Н., Беспалова И.А., Пасюкова Н.И., Тынянова В.И. Токсичность липополисахаридов вакцинного штамма Yersinia pestis EV76 для белых мышей, сенсибилизированных D-галактозамином. Журн.

микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 2011; 1:74–6.
2. Соколова Е.П., Марченков В.И., Демидова Г.В., Зюзина В.П., Беспалова И.А., Павлович Н.В., Ерёменко Н.С., Веркина Л.М., Тынянова В.И. Комплексы «мышиного» токсина чумно-

Л.М., 1ынянова В.И. Комплексы «мышиного» токсина чумного микроба с модифицированными формами липополисахарида Yersinia pestis и с липополисахаридами других бактерий. Биотехнология. 2001; 4:53–8.

3. Тынянова В.И., Зюзина В.П., Демидова Г.В., Соколова Е.П., Писанов Р.В., Беспалова И.А., Бородина Т.Н., Анисимов Б.И., Мишанькин Б.Н. Токсичность препаратов липополисахаридов из культуры Yersinia pestis EV76, выращенной при 28 °С и 37 °С. Биотехнология. 2003; 6:10–6.

4. Хаитов Р.М., Игнатъева Г.А., Сидорова И.Г. Иммунология. М.: Медицина; 2000. 430 с.

5. Galanos C. Freudenberg M.A. Reuter W. Galactosomina.

5. Galanos C., Freudenberg M.A., Reuter W. Galactosamine-induced sensitization to the lethal effects of endotoxin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1979; 76:5939–43.

6. Knirel Y.A., Anisimov A.P. Lipopolysaccharide of *Yersinia pestis*, the cause of plage: structure, genetics, biological properties.

Acta Nature. 2012, 4(13):45-58.

References

1. Demidova G.V., Zyuzina V.P., Sokolova E.P., Borodina T.N., Bespalova I.A., Pasyukova N.I., Tynyanova V.I. [Toxicity of *Yersinia pestis* EV76 to D-galactosamine sensitized LPSs white mice]. *Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol.* 2011; 1:74–6.

2. Sokolova E.P., Marchenkov V.I., Demidova G.V., Zyuzina V.P., Bespalova I.A., Pavlovich N.V., Eremenko N.S., Verkina L.M., Tynyanova V.I. [Plague agent murine toxin complexes with modified *Yersinia pestis* LPS-forms and LPSs of other bacteria]. *Biotekhnologiya*. 2001, 4:53–8.

3. Tynyanova V.I., Zyuzina V.P., Demidova G.V., Sokolova E.P., Pisanov R.V., Bespalova I.A., Borodina T.N., Anisimov B.I., Mishan'kin B.N. [LPS preparations' toxicity, obtained from *Yersinia pestis* EV76 culture grown at 28 °C and 37 °C]. *Biotekhnologiya*. 2003, 6:10–6.

4. Khaitov R.M., Ignat'eva G.A., Sidorova I.G. [Immunology]. M.: "Meditsina", 2000. 430 p.

5. Galanos C., Freudenberg M.A., Reuter W. Galactosamine-induced sensitization to the lethal effects of endotoxin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1979; 76:5939–43.

6. Knirel Y.A., Anisimov A.P. Lipopolysaccharide of *Yersinia pestis*, the cause of plage: structure, genetics, biological properties. *Acta Nature*. 2012, 4(13):45–58.

Authors:

Demidova G.V., Zyuzina V.P., Sokolova E.P., Pasyukova N.I., Bespalova I.A., Borodina T.N., Tynyanova V.I. Rostov-on-Don Research Anti-Plague Institute. 117/40, M.Gor'kogo St., Rostov-on-Don, 344002, Russian Federation. E-mail: plague@aaanet.ru

Об авторах:
Демидова Г.В., Зюзина В.П., Соколова Е.П., Пасюкова Н.И., Беспалова И.А., Бородина Т.Н., Тынянова В.И. Ростовский-на-Дону научно-исследовательский противочумный институт. Российская Федерация, 344002, Ростов-на-Дону, ул. М.Горького, 117/40. E-mail: plague@aaanet.ru

Поступила 05.03.14.