

В.И.Дубровина, Ж.А.Коновалова, В.Б.Николаев, В.В.Войткова, С.А.Татарников, А.В.Мазепа,
Е.Ю.Марков, Ю.О.Попова, О.В.Юрьева

ОСОБЕННОСТИ ВЛИЯНИЯ ЛИПОПОЛИСАХАРИДА ТУЛЯРЕМИЙНОГО МИКРОБА РАЗНЫХ ПОДВИДОВ НА МЕТАБОЛИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ ФАГОЦИТОВ *IN VITRO*

ФГУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока»

Получены экспериментальные препараты липополисахарида (ЛПС) *Francisella tularensis* четырех подвидов: *tularensis*, *holarctica*, *mediasiatica*, *novicida* методом твин-экстракции. Дана физико-химическая характеристика полученных препаратов. Изучено влияние ЛПС возбудителя туляремии разных подвидов на фагоцитарное звено иммунитета экспериментальных животных в условиях *in vitro*. Показано, что биомолекулы ЛПС проявляют слабое стимулирующее воздействие на кислород- и нитроксидзависимые бактерицидные системы и не обладают цитопатогенетическим свойством для активации апоптоза фагоцитов. Полученные результаты позволяют предположить, что такая инертность ЛПС возбудителя туляремии обусловлена особенностями его строения.

Ключевые слова: возбудитель туляремии, липополисахарид, фагоциты.

V.I.Dubrovina, Zh.A.Kononova, V.B.Nikolaev, V.V.Voitkova, S.A.Tatarnikov, A.V.Mazepa, E.Yu.Markov,
Yu.O.Popova, O.V.Yur'eva

Peculiarities of the Effect of the Lipopolysaccharide of Tularemia Microbe of Different Subspecies upon Metabolic Activity of Phagocytes *in Vitro*

Irkutsk Research Anti-Plague Institute of Siberia and Far East

Experimental preparations of the lipopolysaccharide (LPS) of *Francisella tularensis* of four subspecies (*tularensis*, *holarctica*, *mediasiatica*, *novicida*) were obtained using Tween extraction method. Physical and chemical characteristics of the obtained preparations are presented. Examined was the effect of tularemia agent of different subspecies upon the phagocytic part of the experimental animals' immunity *in vitro*. LPS biomolecules demonstrated weak stimulating effect upon oxygen- and nitroxide-dependent bactericidal systems and lacked cytopathogenicity for phagocytes apoptosis activation. The obtained results suggest that such inactivity of tularemia agent LPS is associated with its structural peculiarities.

Key words: tularemia agent, lipopolysaccharide, phagocytes.

Несмотря на то, что липополисахарид туляремиального микроба не является типичным провоспалительным эндотоксином [9], тем не менее, биомолекула ЛПС рассматривается как один из основных факторов патогенности возбудителя туляремии. Однако для реализации токсических свойств необходимо представление ЛПС *in vivo* живыми бактериальными клетками типичных природных штаммов возбудителя. Возможно, что только живая клетка, преодолевая барьеры макроорганизма, обеспечивает доставку ЛПС в функционально-активном состоянии к мишеням, необходимым для проявления его максимально токсического действия [3, 4]. В настоящее время некоторые исследователи полагают, что О-антигеном возбудителя туляремии является не липополисахарид, как у энтеробактерий, а липоолигосахарид (ЛОС). В отличие от S-ЛПС – полноценных протективных иммуногенов, ЛОС – непротективны или малопротективны, что, вероятно, облегчает выживание возбудителя в макроорганизме [7]. Известно, что ЛПС туляремиального микроба относится к консервативным (неспецифическим, невариабельным) патоген-ассоциированным молекулярным структурам, которые оказывают множественные эффекты на сигналы, генерируемые клетками врожденной иммунной системы [1]. К настоящему времени малоизученным остается вопрос влияния ЛПС на

бактерицидные факторы иммунитета, а именно кислородзависимые цитотоксические механизмы фагоцитов, поскольку именно они играют главную роль в процессе деградации объекта фагоцитоза. Особую актуальность при изучении патогенеза туляремии приобретают исследования механизмов клеточной адаптации, в частности оценка апоптоза клеток иммунофагоцитарной системы.

Целью работы явилось изучение влияния препаратов ЛПС туляремиального микроба разных подвидов на функциональное состояние клеток иммунофагоцитарной системы в условиях *in vitro*.

Материалы и методы

В работе использовали музейные (ФГУЗ «ИркутскНИПЧИ Сибири и ДВ») штаммы *Francisella tularensis* subsp. *tularensis* Schu 11; *F. tularensis* subsp. *holarctica* И-250; *F. tularensis* subsp. *mediasiatica* А-120; *F. tularensis* subsp. *novicida* F 6168. ЛПС выделяли из бактериальной массы твин-экстракцией. Культуру выращивали в течение 2 сут на среде Анциферова при 37 °С, смывали стерильным 0,9 % раствором натрия хлорида (рН 7,2) и приготавливали суспензию в концентрации 20·10⁹ м.к. по ОСО мутности ГИСК им. Л.А.Тарасевича. К полученной микробной взвеси стерильно добавляли неионный детергент Твин-80

(«Serva») до конечной концентрации 1 %, выдерживали 2 ч при 37 °С. Полученную суспензию прогревали на водяной бане 10 мин при 90 °С, периодически перемешивая. Полученную микробную массу проверяли на стерильность и, при отсутствии специфического роста, центрифугировали при 10000 g в течение 30 мин для освобождения от дебриса. Супернатант подвергали ультрацентрифугированию при 105000 g 2 ч при 4 °С «Spinko L2-65B» («Bekman»). Образовавшийся осадок ресуспендировали в минимальном количестве дистиллированной воды и лиофильно высушивали. Полученный препарат растворяли в 0,01 М аммоний-бикарбонатном буфере (pH 8,5), содержащем 0,2 % додецилсульфата натрия и хроматографировали образец на колонке с Сефакрилом-С 300 («Pharmacia»), уравновешенной 0,01 М аммоний-бикарбонатным буфером (pH 8,5), содержащим 0,1 % додецилсульфата натрия. Препарат элюировали этим же буфером и собирали во фракции объемом 2 мл. Фракции, содержащие первый пик, объединяли и диализовали в течение суток против проточной воды. Содержащийся препарат преципитировали добавлением десяти объемов охлажденного этанола в течение суток на холоде и осаждали центрифугированием при 6000 об./мин в течение 40 мин. Осадок растворяли в небольшом объеме дистиллированной воды и лиофильно высушивали.

ЛПС в полученных экспериментальных образцах выявляли колориметрическим методом с использованием карбоцианинового красителя. В полученных экспериментальных препаратах ЛПС определяли содержание нуклеиновых кислот [6], белка [11] и углеводов [2]. Электрофоретический анализ ЛПС проводили в 12,5 % полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия с окрашиванием ионами серебра (ДСН-электрофорез) [10, 12].

ЛПС *Salmonella enteritidis* («Sigma») использовали в качестве типичного S-ЛПС. Острую токсичность полученных препаратов определяли на 85 белых беспородных мышах массой 18–20 г при однократном подкожном введении в дозах 10, 50 и 100 мкг сухого вещества. Учет результатов проводили в течение 7 сут после инокуляции ЛПС.

Материалом для исследования служили перитонеальные макрофаги (ПМ), которые получали общепринятым методом от 253 беспородных (250–300 г) морских свинок, после умерщвления животных в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных» (Приложение к приказу МЗ СССР № 755 от 12.08.1977 г.) и «Правилами лабораторной практики в Российской Федерации» (Приложение к приказу МЗ РФ от 19.06.2003 г. № 267). В тесте с трипановым синим [5] количество жизнеспособных клеток составило 96–98 %. ПМ примировали ЛПС в дозе 10 мкг/мл фагоцитов в течение 180 мин при 37 °С с последующим определением активности кислород- (НСТ-тест, НАДФ-Н-оксидаза) и нитроксидзависимого метаболизма (NO-синтаза) [1]. Чувствительность фагоцитов к ЛПС-индуцированному апоптозу изуча-

ли с помощью тест системы Caspase-3 Colorimetric Kit (R&D Systems, Inc.) согласно инструкции производителя. Для подтверждения участия каспазы-3 в индукции апоптоза иммуноцитов использовали ингибитор этого фермента Z-VAD-FMK (R&D Systems, Inc.) в концентрации 100 мкМ. Контролем служили интактные клетки. Результаты исследований обрабатывали стандартными статистическими методами. Определяли среднюю арифметическую, среднюю ошибку. Для оценки достоверности различий применяли параметрический двухвыборочный t-тест Стьюдента. Различия считали достоверными при уровне значимости $P < 0,001$.

Результаты и обсуждение

Установлено, что ЛПС грамотрицательных бактерий ответственны за ряд патофизиологических процессов в макроорганизме. Для изучения этих процессов чаще всего используют ЛПС, полученный водно-фенольным методом, способный не только увеличивать выход препарата, а также снижать содержание белка в препарате, но и приводить к частичной деградации ЛПС, что может сказываться на его свойствах. Поэтому для выделения ЛПС из разных подвидов туляреимийного микроба был применен метод с использованием неионного детергента [8], позволившего получить ЛПС с минимальным повреждением их нативной структуры. Полученные ЛПС по своим физико-химическим свойствам не отличались от препаратов, выделяемых классическим водно-фенольным способом. Электрофоретический анализ показал характерную для ЛПС гетерогенность, проявляющуюся множественностью полос в виде «лестницы» при окраске геля ионами серебра. При взаимодействии с карбоциановым красителем «Stains all» препараты проявляли характерный для грамотрицательных бактерий метакроматический эффект. Содержание нуклеиновых кислот, белка, углеводов в исследуемых препаратах ЛПС колебалось в пределах 0,4–0,9; 4,7–8,4; 11,4–17,8 % соответственно.

Показано, что препараты ЛПС в дозах 10, 50 и 100 мкг не токсичны для белых мышей, тем не менее, при введении экспериментальным животным 100 мкг ЛПС имело место увеличение размеров селезенки и регионарных (преимущественно паховых) лимфатических узлов (в случае ЛПС туляреимийного микроба подвида *tularensis* в 1,5–2,0 раза).

Известно, что активные формы кислорода (АФК) и азота (АФА) являются промежуточными продуктами, которые участвуют в защите хозяина от возбудителя туляремии. Продукция посредников АФК (например, супероксида) зависит от НАДФ-Н-оксидазы фагоцитов. АФА могут образовываться посредством конструктивных синтаз монооксида азота, но высокие уровни АФА продуцируются только после активизации индуцированных форм фермента [9].

Как показали результаты проведенных исследо-

ваний, препараты ЛПС *F. tularensis* обладают слабым стимулирующим воздействием на активность ферментов окислительного взрыва в перитонеальных макрофагах интактных морских свинок. Суммарную активность ферментов дыхательной цепи фагоцитов оценивали в НСТ-тесте, который относится к основным показателям, характеризующим состояние макрофагальной системы. Значения НСТ-теста и показатели активности НАДФ-Н-оксидазы в клетках, стимулированных туляремиными ЛПС, незначительно отличались от контрольных значений (интактные клетки). Материалы, полученные в ходе эксперимента, свидетельствуют о том, что препараты ЛПС туляреминого микроба, независимо от фенотипических свойств, оказывают менее выраженное стимулирующее действие на активность кислородзависимого метаболизма (КЗМ) фагоцитов по сравнению с ЛПС *S. enteritidis*. Показатели НСТ-теста и активности НАДФ-Н-оксидазы у фагоцитов, примированных сальмонеллезным ЛПС были соответственно в 1,2 и 1,6 раза выше чем у аналогичных клеток, стимулированных ЛПС туляреминого микроба ($P < 0,001$). Достоверных различий по степени влияния ЛПС туляреминого микроба разных подвидов на активацию КЗМ у перитонеальных макрофагов не выявлено.

В связи с тем, что NO играет важную роль в регуляции иммунного ответа и реализации бактерицидных свойств макроорганизма, было изучено влияние ЛПС туляреминого микроба разных подвидов на активность NO-синтазы перитонеальных макрофагов. Установлено, что по сравнению с контролем все исследованные препараты ЛПС незначительно повышают продукцию монооксида азота фагоцитами экспериментальных животных. Следует отметить, что среди использованных ЛПС *F. tularensis* достоверных различий по уровню стимуляции активности NO-синтазы не выявлено, однако наибольшим стимулирующим эффектом обладает препарат, полученный из туляреминого микроба подвида *novicida*. Значения концентрации NO_2^- в этом случае были $(37,5 \pm 0,8)$ пг/ 10^6 фагоцитов. Установлено незначительное по сравнению с другими ЛПС снижение активности NOS макрофагов, стимулированных препаратом ЛПС *F. tularensis* Schu 11 ($35,3 \pm 0,6$) пг/ 10^6 фагоцитов. Наоборот, ЛПС *S. enteritidis* оказался потенциальным стимулятором образования NO_2^- . Показатели активности NO-синтазы перитонеальных макрофагов, примированных сальмонеллезным

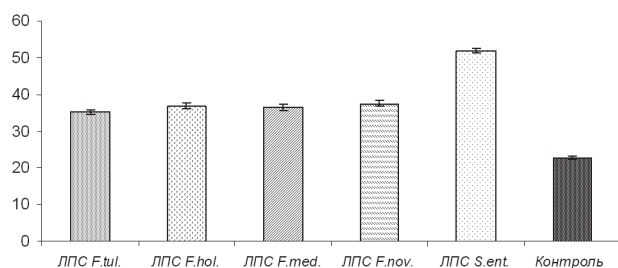


Рис. 1. Функциональная активность NOS (мкМ NO_2^- / 10^6 фагоцитов)

ЛПС, были в 1,4 раза выше чем у фагоцитов после взаимодействия с ЛПС *F. tularensis* (рис. 1).

Существенных различий в степени воздействия на активность бактерицидных систем фагоцитов между ЛПС туляреминого микроба подвидов *tularensis*, *holarctica*, *mediasiatica*, *novicida* не выявлено. Это согласуется с данными литературы о сходстве структуры биоактивного компонента ЛПС (липид А) у указанных выше подвидов [12].

При изучении апоптоза клеток иммунофагocитарной системы особое внимание уделяется эффекторной каспазе-3, так как после ее активации процесс программируемой клеточной гибели считается необратимым. Установлено, что у макрофагов, примированных ЛПС туляреминого микроба разных подвидов, имеется тенденция к активации апоптоза по сравнению с контролем, но различия не были достоверными (рис. 2).

Установлено, что при концентрации 100 мкМ Z-VAD-FMK степень ингибирования апоптоза перитонеальных макрофагов была максимальной и соответствовала показателю активности каспазы-3 в контроле. Результаты сравнительного анализа указывают на достоверные различия между туляреминым и сальмонеллезным ЛПС в степени воздействия на апоптотическую активность фагоцитов. Показано, что активность каспазы-3 иммуноцитов, примированных ЛПС *S. enteritidis*, была выше в 1,3 раза ($P < 0,001$) чем у клеток, инкубированных с ЛПС *F. tularensis*, независимо от подвидовой принадлежности.

Таким образом, препараты ЛПС (в дозе 10 мкг/мл фагоцитов), выделенные твин-экстракцией из штаммов *F. tularensis* подвидов *tularensis*, *holarctica*, *mediasiatica*, *novicida*, являются слабым антигенным стимулом для активации кислород- и нитроксидзависимых бактерицидных механизмов, а также апоптоза клеток млекопитающих по сравнению с ЛПС, выделенным из кишечных бактерий. Вероятно, такая биологическая инертность целесообразна и является специфическим свойством патогенных бактерий [4]. Отсутствие ответа иммунокомпетентных клеток на сигнал ЛПС обеспечивает патогенам на первых этапах взаимодействия с организмом хозяина беспрепятственное преодоление гуморальных и клеточных

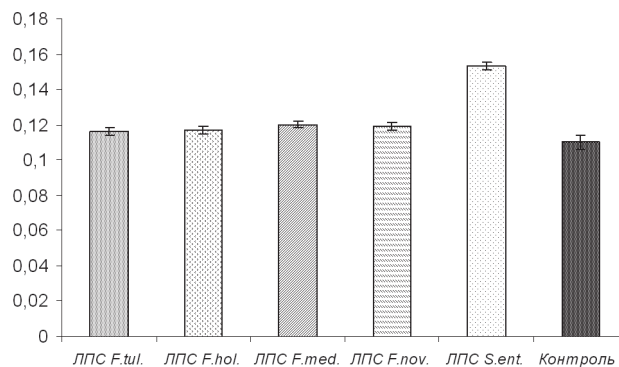


Рис. 2. Функциональная активность каспазы-3 (OD405) перитонеальных макрофагов

барьеров. Выявленные нами отличия в характере воздействия на функциональное состояние клеток иммунофагоцитарной системы туляремиального ЛПС от «классического» эндотоксина бактерий кишечной группы, по-видимому, обусловлены особенностями строения О-антигена *F. tularensis*. Полученные данные по изучению структуры ЛПС туляремиального микроба разных подвидов указывают на необходимость усовершенствования методов получения препаратов ЛПС, способствующих сохранению молекулы ЛПС в состоянии, максимально приближенном к нативному. Результаты сравнительного анализа влияния препаратов ЛПС возбудителя туляремии разных подвидов на метаболическую активность фагоцитов могут способствовать пониманию механизмов иммуно- и патогенеза туляремии и открывают перспективы для дальнейшего изучения структуры липополисахарида возбудителя туляремии разных подвидов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ахматова Н.К., Киселевский М.В. Врожденный иммунитет: противоопухолевый и противoinфекционный. М.: Практическая медицина; 2008. 256 с.
2. Герхардт Ф. и др., редакторы. Методы общей бактериологии. М.: Мир; 1984. С. 292–5.
3. Оноприенко Н.Н., Павлович Н.В. Роль липополисахарида в токсичности бактерий рода *Francisella*. Мол. генет. 2003; 3:25–8.
4. Павлович Н.В., Тынянова В.И. Возможные механизмы реализации токсического потенциала липополисахаридов патогенных бактерий. Мол. генет. 2005; 2:9–13.
5. Самсонова М.В., Черняев А.Л. Стандартные цитопрепараты бронхоальвеолярного лаважа в исследовании и патологии легких. Лаборатория. 1997; 6:7–9.
6. Спирин А.С. Спектрофотометрическое определение суммарного количества нуклеиновых кислот. Биохимия. 1958; 23(5):656–62.
7. Сухарь В.В., Непомнящая Н.Б. Липоолигосахаридный О-антиген *Francisella tularensis*. Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 2009; 5:110–13.
8. Шишкина Л.П., Марков Е.Ю., Меринова Л.В., Суханов

Н.А. А.с.1692580. Способ получения туляремиального антигена. (СССР). № 4676656/13. Огубл. 23.11.91. Бюл. № 43. 3 с.

9. Hajjar A.M., Harvey M.D., Shaffer S.A., Goodlett D.R., Sjostedt A., Edebro H. et al. Lack of in vitro and in vivo recognition of *Francisella tularensis* subspecies lipopolysaccharide by Toll-like receptors. Infect. Immun. 2006; 74(12):6730–8.
10. Laemmli U.K., Favre M. Maturation of the head of bacteriophage T4. DNA packing events. J. Mol. Biol. 1973; 80:575–99.
11. Lowry O.H., Rosenbrough N.R., Farr A.L., Randall R.J. Protein measurement with the Folin phenol. J. Biol. Chem. 1951; 193(1):265–75.
12. Tsai C.M., Frasch C.E. A sensitive silver stain for detecting lipopolysaccharides in polyacrylamide gels. Anal. Biochem. 1982; 119(1):115–9.

References (Presented are the Russian sources in the order of citation in the original article)

1. Akhmatova N.K., Kiselevskii N.V. [Innate Immunity: Anti-Cancer and Anti-Infectious]. M.: Prakt. Med.; 2008. 256 p.
2. Gerhardt F. et al., editors [Methods in General Bacteriology]. M.: Mir. 1984.
3. Onoprienko N.N., Pavlovich N.V. [Role of lipopolysaccharide in toxicity of *Francisella* genus bacteria]. Mol. Gen. 2003; 3:25–8.
4. Pavlovich N.V., Tytyanova V.I. [Probable mechanisms of realization of the toxic potential of pathogenic bacteria lipopolysaccharides]. Mol. Gen. 2005; 2: 9–13.
5. Samsonova M.V., Chernyaev A.L. [Standard cytopreparations in examination of lung pathology]. Laboratoria. 1997; 6:7–9.
6. Spirin A.S. [Spectrophotometric determination of the total nucleic acids amount]. Biokhimiya. 1958; 23(5):656–62.
7. Sukhar' V.V., Nepomnyashchaya N.B. [Lipooligosaccharide O antigen of *Francisella tularensis*]. Zh. Mikrobiol., Epidemiol. Immunobiol. 2009; 5:110–13.
8. Shishkina L.P., Markov E.Yu., Merinova L.V., Sukhanov N.A. [Method of tularemia antigen obtaining]. USSR Inventor's Certificate 1692580. 23.11.1991.

Authors:

Dubrovina V.I., Konvalova Zh.A., Nikolaev V.B., Voitkova V.V., Tatarnikov S.A., Mazepa A.V., Markov E.Yu., Popova Yu.O., Yur'eva O.V. Irkutsk Research Anti-Plague Institute of Siberia and Far East. Trilissera St., 78, Irkutsk, 664047, Russia. E-mail: adm@chumin.irkutsk.ru

Об авторах:

Дубровина В.И., Коновалова Ж.А., Николаев В.Б., Войткова В.В., Татарников С.А., Мазепа А.В., Марков Е.Ю., Попова Ю.О., Юрьева О.В. Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири и ДВ. 664047, Иркутск, ул. Трилисера, 78. E-mail: adm@chumin.irkutsk.ru

Поступила 22.06.10.