

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

ТОЛЕРАНТНОСТЬ К ЛИПОПОЛИСАХАРИДАМ ВАКЦИННОГО И ВИРУЛЕНТНОГО ШТАММОВ *YERSINIA PESTIS* В УСЛОВИЯХ *IN VIVO*

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

Воспроизведен феномен эндотоксиновой толерантности к различным формам липополисахарида (ЛПС) вакцинного (EV 76) и вирулентного (231) штаммов *Y. pestis*, выращенных при 28 и 37 °С, и ЛПС *Escherichia coli* S- и R- хемотипов в условиях *in vivo*. Установлено, что первичное и повторное введение белым мышам препаратов ЛПС чумного микроба во всех сочетаниях приводит к подавлению воспалительного ответа вне зависимости от температурных и штаммовых различий строения ЛПС. При сочетании ЛПС *Y. pestis* с ЛПС *E. coli* ответ организма зависит от формы ЛПС и может варьировать от полной или частичной толерантности до полного ее отсутствия.

Ключевые слова: эндотоксиновая толерантность, липополисахарид, *Yersinia pestis*.

G.V.Demidova, V.P.Zyuzina, E.P.Sokolova, N.I.Pasyukova, I.A.Bespalova, T.N.Borodina, V.I.Tyryanova

In vivo Tolerance to Lipopolysaccharides of Vaccine and Virulent *Yersinia pestis* Strains

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

The endotoxin tolerance phenomenon has been reproduced *in vivo*. Different forms of lipopolysaccharide (LPS) of vaccine (EV 76) and virulent (231) *Y. pestis* strains, grown at 28 and 37 °C, and LPS of S- and R-chemotypes of *Escherichia coli* were injected to the white mice in different combinations. Determined is the fact that primary and repeated injection of plague microbe LPS preparations in any combinations results in suppression of inflammatory response regardless of the differences in the LPS structure. In case of combined administration of *Y. pestis* LPS and *E. coli* LPS, the response depends on the LPS form and can vary from complete or partial tolerance to its total absence.

Key words: endotoxin tolerance, lipopolysaccharide, *Yersinia pestis*.

Как известно, *Yersinia pestis* относится к числу высоковирулентных бактерий, патогенез которых обусловлен действием эндотоксина. Своеобразие липополисахарида (ЛПС) чумного микроба заключается в выраженной вариабельности его химической структуры внутри вида и температурозависимом характере синтеза. ЛПС *Y. pestis*, выделенные из бактерий, выращенных при температуре тела пойкилотермного (ЛПС28) и теплокровного (ЛПС37) хозяина, отличаются по химическому составу сахаров коровой области и степени ацилирования жирных кислот липида А [3, 4]. Обе формы активируют специфичный для ЛПС рецептор TLR4 миелоидных клеток иммунной системы макроорганизма. ЛПС28 и ЛПС37, в соответствии с химическим строением, обладают различным иммуномодулирующим действием. Так, если ЛПС28 является относительно сильным индуктором синтеза провоспалительных цитокинов, то цитокин-индуцирующая активность ЛПС37 выражена слабо и, как недавно установлено, он обладает иммуносупрессирующим действием [5, 6].

При развитии чумной инфекции одновременное присутствие форм ЛПС, различных по химическому строению и иммуномодулирующим свойствам, *a priori* предполагает возможность прямой и повторной активации иммунокомпетентных клеток гомологичными и гетерологичными формами ЛПС *Y. pestis*, что может вызывать эффект эндотоксиновой толерантности. Насколько нам известно, в литературе отсутству-

ют сведения о воспроизведении этого феномена на модели ЛПС чумного микроба. В настоящей работе изучали толерантность лабораторных животных к различным формам ЛПС чумного микроба, выделенным из вакцинного (EV 76) и вирулентного (231) штаммов *Y. pestis*, выращенных как при 28, так и при 37 °С.

Материалы и методы

В работе использовали ЛПС двух штаммов чумного микроба – вакцинного *Y. pestis* EV 76 и высоковирулентного *Y. pestis* 231. Бактерии выращивали в течение 48 ч. на пластинках агара LB (Difco, США) при температуре 28 и 37 °С. ЛПС выделяли по методу O.Westphal [8]. В работе использовали также коммерческие препараты S-ЛПС *Escherichia coli* 055:B5 (Fluka, Israel) и R-ЛПС *E. coli* J5, Rc мутант (Sigma, Germany).

Токсическую активность ЛПС проверяли на беспородных белых мышах. Для этого соответствующие дозы исследуемых препаратов вводили внутрибрюшинно в объеме 0,1 мл. Срок наблюдения за животными составлял 1–3 сут.

Условия постановки опытов по воспроизведению феномена эндотоксиновой толерантности были подобраны экспериментально. Предварительно определяли токсичность всех препаратов ЛПС для интактных животных и мышей, сенсibilизированных D-галактозамином (D-GalN). Доза всех пре-

паратов ЛПС, вводимая при первичной активации иммунных клеток, была нетоксична для биопробных животных и равнялась 50 мкг/мышь. Для повышения чувствительности животных к действию ЛПС повторное введение ЛПС проводили через 90 мин совместно с D-GalN [1]. При повторной активации использовали дозы ЛПС, которые на фоне D-GalN вызывали гибель 100 % животных (20 мкг/мышь). Каждая экспериментальная группа состояла из 10 животных. Отсутствие гибели белых мышей после повторного введения им препарата ЛПС служило показателем эндотоксиновой толерантности. Степень толерантности оценивали, используя условные критерии: полная толерантность – при повторной активации выживало ≥ 50 % животных, частичная (или неполная) – живыми оставалось менее 50 % мышей. Гибель 100 % белых мышей свидетельствовала об отсутствии толерантности.

Результаты и обсуждение

Эффект эндотоксиновой толерантности оценивали для различных форм ЛПС: ЛПС28 и ЛПС37 *Y. pestis* EV 76 и *Y. pestis* 231. Коммерческие препараты R- и S-форм ЛПС *Escherichia coli*, молекулярный механизм иммунного действия которых достаточно полно изучен, использовали для сравнения. Экспериментальная «сетка» включала 36 вариантов постановки опытов с учетом всех возможных сочетаний шести препаратов ЛПС при первичной и повторной активации. А именно, первичная активация белых мышей одним из препаратов ЛПС являлась «фоном» для повторной активации всеми шестью формами ЛПС, взятыми в работу. Такие «перекрестные» сочетания позволяли судить о степени идентичности молекулярных механизмов действия исследуемых ЛПС в условиях *in vivo*.

Результаты проведенных экспериментов представлены в таблице. Анализ полученных данных позволяет условно выделить две группы ЛПС, сочетание которых вызывает различный иммунный ответ организма: это все варианты взаимодействия ЛПС *Y. pestis* с ЛПС *Y. pestis* и варианты сочетаний ЛПС *Y. pestis*/ЛПС *E. coli*. Как выяснилось, первичная и повторная активация белых мышей препаратами ЛПС чумного микроба во всех случаях приводит к подавлению

воспалительного ответа организма, при этом эффект эндотоксиновой толерантности не зависит от температурных вариаций химического строения ЛПС *Y. pestis*, штаммовых различий, а также последовательности введения препаратов. Степень толерантности достаточно монотонна – в 14 случаях из 16 выживало ≥ 50 % животных, т. е. наблюдалась полная толерантность, и лишь для сочетаний ЛПС28 *Y. pestis* EV 76 / ЛПС 28 *Y. pestis* 231 и ЛПС37 *Y. pestis* EV 76 / ЛПС28 *Y. pestis* EV 76 отмечена толерантность частичного типа (жизнеспособны менее 50 %).

Иная закономерность иммунного ответа наблюдается при комбинации ЛПС *Y. pestis* с ЛПС *E. coli*. Как выяснилось, в проявлении феномена толерантности для ЛПС вакцинного штамма принципиальным является не химическое строение, а последовательность введения препаратов ЛПС биопробным животным. В случае, когда первичная обработка животных проводится ЛПС28 или ЛПС37 *Y. pestis* EV 76, а повторная – S- или R-формами ЛПС *E. coli*, наблюдается гибель 100 % животных, т.е. эффект толерантности отсутствует. При обратной последовательности введения ЛПС – сначала S- или R-форма ЛПС *E. coli*, а затем ЛПС28 или ЛПС37 *Y. pestis* 76 – воспалительный ответ подавлен (защита ≥ 50 %). Факт влияния последовательности введения ЛПС различных видов бактерий на проявление толерантности у биопробных животных описан в литературе, но научного объяснения в настоящее время не имеет [2].

Для ЛПС вирулентного штамма в воспроизведении феномена толерантности ЛПС *Y. pestis* 231 / ЛПС *E. coli*, в отличие от вакцинного *Y. pestis* EV 76, существенную роль играет не последовательность введения препаратов ЛПС, а химическое строение ЛПС как чумного микроба, так и ЛПС *E. coli*. Экспериментально установлено, что все сочетания R-формы ЛПС *E. coli* с ЛПС28 и ЛПС37 *Y. pestis* 231 защищают животных от гибели, при этом выживают ≥ 50 %. В экспериментах с S-формой ЛПС *E. coli* эффект толерантности, как оказалось, различен для ЛПС28 и ЛПС37 *Y. pestis* 231. При сочетании S-формы ЛПС *E. coli* с ЛПС37 *Y. pestis* 231 в любой последовательности отмечается гибель 100 % животных. В то же время при комбинации S-формы ЛПС *E. coli* с ЛПС28 *Y. pestis* 231 наблюдается эффект полной толерантности (жизнеспособны ≥ 50 %).

Эффект гомо- и гетеротолерантности к ЛПС *Y. pestis* и *E. coli* на модели белых мышей, обработанных D-GalN

| Препараты ЛПС* (первичное введение) | Препараты ЛПС** (повторное введение на фоне D-GalN***) | | | | | |
|--|--|----------------------------|------------------------------|------------------------------|----------------------|----------------------|
| | ЛПС37 <i>Y. pestis</i> 231 | ЛПС28 <i>Y. pestis</i> 231 | ЛПС37 <i>Y. pestis</i> EV 76 | ЛПС28 <i>Y. pestis</i> EV 76 | S-ЛПС <i>E. coli</i> | R-ЛПС <i>E. coli</i> |
| ЛПС37 <i>Y. pestis</i> 231 | + | + | + | + | - | ± |
| ЛПС28 <i>Y. pestis</i> 231 | + | + | + | + | + | ± |
| ЛПС37 <i>Y. pestis</i> EV 76 | + | + | + | ± | - | - |
| ЛПС28 <i>Y. pestis</i> EV 76 | + | ± | + | + | - | - |
| S-ЛПС <i>E. coli</i> | - | + | + | + | + | ± |
| R-ЛПС <i>E. coli</i> | + | + | + | + | + | + |

*Доза ЛПС – 50 мкг/мышь. **Доза ЛПС – 20 мкг/мышь. ***Доза D-GalN – 30 мг/мышь.

Примечания: «+» – количество выживших мышей ≥ 50 %; «±» – количество выживших мышей < 50 %; «-» – 100 % гибель мышей.

Обращает на себя внимание тот факт, что в экспериментах с ЛПС28 и ЛПС37 вирулентного штамма *Y. pestis* 231 / R- и S-формы ЛПС *E. coli* результаты близки к эффекту, наблюдаемому в контрольных опытах по перекрестному введению биопробным животным препаратов R- и S-форм ЛПС *E. coli*. Сходство иммунных ответов между ЛПС28 *Y. pestis* 231 и S-ЛПС *E. coli* позволяет предположить, что молекулярный механизм активации и передачи сигнала ЛПС28 максимально приближен к таковому S-формы *E. coli*. Аналогия, которая прослеживается между ЛПС37 *Y. pestis* 231 и R-ЛПС *E. coli*, свидетельствует о том, что действие ЛПС37 *Y. pestis* 231 сопоставимо, но не идентично с действием R-ЛПС *E. coli*.

По литературным данным, рестимуляция TLR 2, 4, 9 иммунокомпетентных клеток различной органной и видовой принадлежности ЛПС чумного микроба на фоне S-ЛПС *E. coli* всегда приводит к супрессии синтеза провоспалительных цитокинов TNF- α и IL-1 [7]. Результаты наших экспериментов в основном совпадают с результатами аналогичных опытов, выполненных в условиях *in vitro*. Исключением является сочетание препаратов ЛПС37 *Y. pestis* 231 и S-ЛПС *E. coli*, введение которых биопробным животным в любой последовательности не приводит к подавлению воспалительного ответа. Эксперименты с ЛПС *Y. pestis* / ЛПС *E. coli* свидетельствуют о том, что ответ организма на воздействие ЛПС28 и ЛПС37 вакцинного и вирулентного штаммов различен и может варьировать от полной или частичной толерантности до полного ее отсутствия. При этом общая закономерность для всех форм ЛПС чумного микроба заключается в подавлении сигнала, вызванного действием R-ЛПС *E. coli*.

Таким образом, в данной работе установлено, что иммунный ответ организма при сочетании ЛПС *Y. pestis* / ЛПС *Y. pestis* отличается от взаимодействия ЛПС *Y. pestis* / ЛПС *E. coli*. Эксперименты с ЛПС *E. coli* позволили выявить различия в иммуномодулирующем действии всех изученных форм ЛПС *Y. pestis*. В то же время при использовании для первичной и повторной активации биопробных животных ЛПС только чумного микроба эти различия нивелируются, и наблюдается эффект эндотоксиновой толерантности.

Общность иммунного ответа на действие раз-

личных по химической структуре ЛПС *Y. pestis* предполагает идентичность молекулярных механизмов процесса эндотоксиновой толерантности для всех форм ЛПС чумного микроба. Дальнейшее изучение этого феномена позволит определить специфику иммуномодулирующего действия ЛПС *Y. pestis* при развитии инфекционного процесса в условиях макроорганизма.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Демидова Г.В., Зюзина В.П., Соколова Е.П., Бородина Т.Н., Беспалова И.А., Пасюкова Н.И. и др. Токсичность липополисахаридов вакцинного штамма *Yersinia pestis* EV 76 для белых мышей, сенсibilизированных D-галактозамином. Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 2011; 1:74–6.
2. Dalpke A., Lehner M. D., Hartung T., Heeg K. Differential effects of CpG-DNA in Toll-like receptor-2/-4/-9 tolerance and cross-tolerance. Immunology. 2005; 116:203–12.
3. Kawahara K., Tsukano H., Watanabe H., Matsuura M. Modification of the structure and activity of lipid A in *Yersinia pestis* lipopolysaccharide by growth temperature. Infect. Immun. 2002; 70(8):4092–8.
4. Knirel Y.A., Linder B., Vinogradov E.V., Kocharova N.A., Senchenkova S.N., Shakhutdinova R.Z. et al. Temperature dependent variations and intraspecies diversity of the structure of the lipopolysaccharides of *Yersinia pestis*. Biochemistry. 2005; 44:731–43.
5. Matsuura M., Takahashi H., Watanabe H., Sato S., Kawahara K. Immunomodulatory properties of *Yersinia pestis* lipopolysaccharides on human macrophages. Clin. Vaccine Immunol. 2010; 17(1):9–55.
6. Montminy S., Khan N., McGrath S., Walkowicz M.J., Sharp F., Conlon J.E. et al. Virulent factors of *Yersinia pestis* are overcome by a strong lipopolysaccharide response. Nature Immun. 2006; 7(10):1066–73.
7. Telepnev M.V., Klimpel G.R., Haithcoat J., Knirel Y.A., Anisimov A.P. Tetraacylated lipopolysaccharide of *Yersinia pestis* can inhibit multiple Toll-like receptor-mediated signaling pathways in human dendritic cells. J. Infect. Dis. 2009; 200(11):1694–702.
8. Westphal O., Jann K. Bacterial lipopolysaccharides extraction with phenol-water and further applications of the procedure. Methods carbohydr. Chem. 1965; 5:83–91.

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

1. Demidova G.V., Zyuzina V.P., Sokolova E.P., Borodina T.N., Bepalova I.A., Pasyukova N.I. et al. [Toxicity of *Yersinia pestis* EV 76 lipopolysaccharides for mice sensitized by D galactosamine]. Zh. Microbiol. Epidemiol. Immunobiol. 2011; 1:74–6.

Authors:

Demidova G.V., Zyuzina V.P., Sokolova E.P., Pasyukova N.I., Bepalova 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, Russia. 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. 344002, Ростов-на-Дону, ул. М.Горького, 117/40. E-mail: plague@aaanet.ru

Поступила 29.11.11.