

- sis from caseous lymphadenitis lesions in Black Alentejano pig (*Sus scrofa domesticus*). *BMC Vet. Res.* 2014, 10: 218.
32. Olson M.E., Ceri H., Morck D.G. et al. Biofilm bacteria: formation and comparative susceptibility to antibiotics. *Can. J. Vet. Res.* 2002, 66:86-92.
 33. Ott L., Höller M., Gerlach R. et al. *Corynebacterium diphtheriae* invasion-associated protein (DIP1281) is involved in cell surface organization, adhesion and internalization in epithelial cells. *BMC Microbiology.* 2010, 10: 2.
 34. Puech V., Chami M., Lemassu A. et al. Structure of the cell envelope of corynebacteria: importance of the non-covalently bound lipids in the formation of the cell wall permeability barrier and fracture plane. *Microbiology.* 2001, 147 (5): 1365-1382.
 35. Puliti M., Von Hunolstein C., Marangi M. Experimental model of infection with non-toxicogenic strains of *Corynebacterium diphtheriae* and development of septic arthritis. *J. Med. Microbiol.* 2006, 55: 229-235.
 36. Reddy B.S., Chaudhury A., Kalawat U. et al. Isolation, speciation, and antibiogram of clinically relevant non-diphtherial *Corynebacteria* (Diphtheroids). *Indian J. Med. Microbiology.* 2012, 30 (1): 52-57.
 37. Rogers E.A., Das A., Ton-That H. Adhesion by pathogenic corynebacteria. *Adv. Exper. Med. Biol.* 2011, 715: 91-103.
 38. Ruiz J.C., D'Afonseca V., Silva A. et al. Evidence for reductive genome evolution and lateral acquisition of virulence functions in two *Corynebacterium pseudotuberculosis* strains. *PLoS One.* 2011, 6: 8551.
 39. Sekizuka T., Yamamoto A., Komiya T. et al. *Corynebacterium ulcerans* 0102 carries the gene encoding diphtheria toxin on a prophage different from the *C. diphtheriae* NCTC 13129 prophage. *BMC Microbiology.* 2012, 12: 72 doi: 10.1186/1471-2180-12-72.
 40. Tsuge Y., Ogino H., Teramoto H. et al. Deletion of *cgR_1596* and *cgR_2070*, encoding NlpC/P60 proteins, causes a defect in cell separation in *Corynebacterium glutamicum* R. *J. Bacteriol.* 2008, 190: 8204-8214.
 41. Wagner J., Ignatius R., Voss S. et al. Infection of the skin caused by *Corynebacterium ulcerans* and mimicking classical cutaneous diphtheria. *Clin. Infect. Dis.* 2001, 33 (9): 1598-1600.
 42. Yeruham L., Elad D., Friedman S. et al. *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in Israeli dairy cattle. *J. Epidemiol. Infect.* 2003, 131 (2): 947-955.

Поступила 15.09.15

Контактная информация: Харсеева Галина Георгиевна, д.м.н., проф., 344022, Ростов-на-Дону, Нахичеванский пер., 29, р.т. (632) 250-41-09

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2016

В.И.Тынянова, В.П.Зюзина, Г.В.Демидова, Е.П.Соколова

СПЕЦИФИЧНОСТЬ ИММУНОМОДУЛИРУЮЩЕГО ДЕЙСТВИЯ ЭНДОТОКСИНА *YERSINIA PESTIS*

Ростовский-на-Дону противочумный институт

Проанализированы собственные и данные литературны о механизмах реализации токсического потенциала липополисахарида (ЛПС) *Yersinia pestis* в условиях макроорганизма. Рассматриваются две формы модификации ЛПС — температурозависимые изменения химической структуры полимеров и изменение их конформации под влиянием факторов микро- и макроорганизмов. Особое внимание уделено сравнительному изучению токсических и иммуномодулирующих свойств указанных форм ЛПС. Сделан вывод, что обе формы ЛПС активируют рецептор TLR4/MD2, индуцируя синтез цитокинов двух типов — провоспалительных и интерферонов. Однако доминантность их сигнальных путей и кросс-регуляция проводимого сигнала зеркально противоположны, в результате чего исходная форма ЛПС инициирует синтез интерферонов, а конформационно измененная — провоспалительных цитокинов. Результаты экспериментов обобщены в виде

схем передачи сигнала рецептором TLR4/MD2 под воздействием двух форм ЛПС *Y. pestis*. Вариации цитокининдуцирующих свойств исходной и конформационно измененной формы ЛПС *Y. pestis* соответствуют иммунному ответу организма на каждой стадии инфекционного процесса: поздний воспалительный ответ по интерфероновому типу характерен для внутриклеточного цикла развития чумы, а гиперпродукция воспалительных цитокинов наблюдается на терминальной стадии инфекционно-токсического шока.

Журн. микробиол., 2016, № 3, С. 104—112

Ключевые слова: *Yersinia pestis*, липополисахарид, модифицированные формы ЛПС, цитокины

V.I.Tunyanova, V.P.Zyuzina, G.V.Demidova, E.P.Sokolova

SPECIFICITY OF IMMUNE MODULATING EFFECT OF *YERSINIA PESTIS* ENDOTOXIN

Rostov-on-Don Institute for Plague Control, Russia

Literature and own data on mechanisms of realization of lipopolysaccharide (LPS) toxic potential of *Yersinia pestis* in the conditions of a macroorganism are analyzed. 2 modifications of LPS are examined — temperature dependent changes of chemical structure of polymers and a change in their conformation under the effect of micro- and macroorganism factors. A special attention is paid to comparative study of toxic and immune modulating properties of the specified LPS forms. Both LPS forms are concluded to activate TLR4/MD2 receptor, inducing synthesis of 2 types of cytokines — pro-inflammatory and interferons. However, dominance of their signal pathways and cross-regulation of the transduced signal are mirrored, and as a result the initial form of LPS initiates interferon synthesis, and conformationally changed — pro-inflammatory cytokines. Results of the experiments are summarized in 2 schemes of signal transfer by TLR4/MD2 receptor under the effect of 2 forms of *Y. pestis* LPS. Variations of cytokine-inducing properties of the initial and conformationally-altered forms of *Y. pestis* LPS corresponds to the immune response of the organism at each stage of the infectious process: late inflammatory response by interferon type is characteristic for intra-cellular cycle of plague development, and pro-inflammatory cytokine hyper-production is observed at the terminal stage of infection-toxic shock.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2016, No. 3, P. 104—112

Key words: *Yersinia pestis*, lipopolysaccharide, modified LPS forms, cytokines

По мнению специалистов основным патогенетическим фактором *Yersinia pestis* является эндотоксин — липополисахарид (ЛПС) — клеточной стенки бактерий. Действие эндотоксина проявляется при любой форме чумы на терминальной стадии инфекции и приводит к развитию септического шока [11 — 13]. Однако механизм реализации токсического потенциала ЛПС до настоящего времени не имеет научного объяснения.

Как известно, ЛПС *Y. pestis* отличается рядом биологических особенностей: он относится к R-хемотипу, химическое строение его весьма вариабельно, а синтез регулируется температурой. При низких температурах выращивания клеток (26 — 28°C) состав липида А гетерогенен и представлен смесью три-, тетра-, пента- и гексаацильных форм с количественным преобладанием последних [11, 12]. Препараты ЛПС28 обладают средней степенью токсичности для биопробных животных и цитокин-индуцирующей способностью [5]. В то же время, ЛПС, выделенный из клеток, выращенных при температуре тела млекопитающего (37°C), отличается от ЛПС28 по химическому составу сахаров и жирных кислот. Липид А ЛПС37 более гомогенен и содержит преимущественно три- и тетраацильные

молекулы. Модификация, которую претерпевает ЛПС37 (гипоацилированный липид А), приводит к изменению его биологических свойств: препарат малотоксичен или вообще нетоксичен для биопробных животных, является слабым индуктором провоспалительных цитокинов и по данным последних лет оказывает супрессирующее действие на сигнальные пути синтеза провоспалительных цитокинов TNF- α , IL-1, IL-6 [5, 14, 15, 20]. По мнению большинства исследователей факт низкой иммуностимулирующей активности ЛПС37 *Y. pestis* биологически целесообразен, поскольку позволяет патогену избегать губительного действия антибактериальных факторов врожденного иммунитета. Тем не менее, три- и тетраацилированные формы липида А, свойственные ЛПС37, являются обязательным условием для проявления вирулентных свойств возбудителя чумы в условиях *in vivo* [11, 12, 15, 19].

По мнению Smith H. et al., высказанному в 1972 г., «*Y. pestis* относится к числу патогенов, токсический компонент которых реализуется непосредственно в организме инфицированного животного», что предполагает переход малотоксичного ЛПС37 в высокотоксичную форму под влиянием факторов макро- и/или микроорганизма.

Сформулированная нами гипотеза заключается в том, что процесс модификации ЛПС *Y. pestis* многоступенчатый и не ограничивается только температурозависимыми изменениями структуры ЛПС. В соответствии со стадиями развития инфекции (внутриклеточная, внеклеточная) ЛПС *Y. pestis*, видимо, может также претерпевать две фазы модификации — на уровне химической структуры ЛПС и на уровне изменения его конформации. При смене хозяев (блоха/теплокровный организм) на этапе внутриклеточного развития решающим фактором модификации ЛПС является температура тела хозяина. По мере развития инфекционного процесса на стадии внеклеточного размножения возбудителя чумы под влиянием факторов макро- и микроорганизмов ЛПС *Y. pestis* вторично модифицируется без изменения химической структуры, а только на уровне конформации молекул. На этом этапе, как мы предполагаем, биологически инертный ЛПС37 *Y. pestis* трансформируется в токсически активную форму и реализует функции, присущие эндотоксину возбудителя чумы.

Модуляторы конформационных изменений бактериальных ЛПС хорошо известны. К ним относятся липополисахарид-ассоциированные протеины микроорганизмов, которые образуют специфический комплекс с ЛПС, изменяют конформацию и усиливают его действие [17]. В условиях макроорганизма подобную функцию выполняют белки и липопротеиды высокой и низкой плотности. Одни из них способствуют формированию токсически активной конформации ЛПС, другие же, напротив, блокируют его активность [8].

Экспериментальной основой сформулированной нами гипотезы послужил феномен, открытый А.Н.Кравцовым и др. в 1993 г. [3], которые установили, что вирулентные свойства бактерий чумы могут быть усилены в условиях *in vitro* под влиянием биологически активного вещества (БАН), присутствующего в эритроцитах крови и тканях паренхиматозных органов млекопитающих. При этом отмечены два важных момента: для проявления феномена необходима предварительная инкубация клеток при температуре 37°C, а усиление вирулентных свойств имеет фенотипический характер.

В дальнейшем результаты исследования этого феномена были изложены в ряде научных публикаций [4, 9]. Установлено, что биологически активное вещество представляет собой низкомолекулярное соединение с выраженными полярными свойствами и относится к классу гликолипидов. Повышение вирулентности *Y. pestis* связано с активацией токсических субстанций, присутствующих в кап-

сильном веществе возбудителя чумы. Выяснили, что под воздействием БАВ изменяется молекулярная организация капсульного вещества бактерий, меняется конформация молекул ЛПС и усиливается их токсичность. Установили также, что в этих условиях ЛПС и специфический белок *Y. pestis* «мышинный» токсин (МТ) могут взаимодействовать между собой с образованием высокотоксичного комплекса ЛПС-МТ. При этом количество МТ и ЛПС, которые по отдельности не токсичны для мышей и морских свинок, в комплексе проявляют высокую токсичность для обоих видов животных. Доказано, что образование физико-химических связей между ними имеет специфический характер и сопровождается изменением конформации молекул ЛПС.

Изменение токсичности ЛПС а priori предполагает различное воздействие исходных и конформационно измененных форм ЛПС на рецепторы TLR4/MD2 фагоцитарных клеток макроорганизма. В настоящей работе обобщены результаты изучения иммуномодулирующих свойств двух форм ЛПС *Y. pestis* [5 — 7].

Объектом исследований служили препараты ЛПС37, выделенные из 37°C культур типичного полноценного высоковирулентного штамма *Y. pestis* 231 (pFra⁺, pCad⁺, pPst⁺, LD₅₀=3÷20 м. к./мышь). Специфика иммуномодулирующего действия ЛПС этого штамма в полной мере адекватна действию эндотоксина *Y. pestis*. Модификацию ЛПС проводили указанными выше двумя методами. Выяснили, что исходный вариант ЛПС37 проявляет достаточно высокую степень токсичности и вызывает гибель животных в дозах 340÷500 мкг (LD₅₀) на мышь. Модификация ЛПС37 «мышинным» токсином или же БАВ усиливает токсические свойства препаратов приблизительно в 2 — 3 раза, при этом значения LD₅₀ ЛПС37-МТ и LD₅₀ ЛПС37-БАВ достоверно не отличаются друг от друга и составляют 110÷250 мкг на мышь [5].

При сравнительном изучении иммуномодулирующих свойств исходных и конформационно измененных форм ЛПС37 экспериментально установлено, что наиболее полную информацию о специфичности действия изучаемых форм ЛПС позволяет получить комплексный подход, состоящий из трех способов: одновременный количественный учет синтеза цитокинов двух типов — провоспалительных (TNF-α) и интерферонов (IFN-γ) в различные промежутки времени (изучение в динамике); определение профиля цитокинового ответа TNF-α и IFN-γ при рестимуляции TLR4 исследуемыми препаратами ЛПС на фоне первичной активации рецептора S-формами или R-формами ЛПС *Escherichia coli*; оценка эффекта эндотоксиновой толерантности к сочетанному действию S- и R- форм ЛПС *E. coli* и исследуемых ЛПС на модели мышей, сенсибилизированных D-галактозаминном.

Все три способа отражают особенности структурно-функциональной организации рецептора TLR4/MD2. Уникальность этого рецептора заключается в том, что он способен активировать две системы передачи сигнала, одна из которых направлена на активацию фактора ядерной транскрипции синтеза провоспалительных цитокинов (NF-κB), а вторая активирует фактор ядерной транскрипции интерферонов (IRF3). Оба пути взаимосвязаны через молекулу бифункционального действия — TRAF6, которая способна переключать сигнал в обоих направлениях [21]. Кроме того, TLR4 относится к рецепторам синергического действия, т. е. его активация сопровождается возбуждением иных Toll-рецепторов и, в частности, TLR2, с которым TLR4 находится в тесной регуляторной взаимосвязи [16]. Таким образом, синтез цитокинов представляет собой суммарный эффект сложного взаимодействия проводящих и регуляторных систем TLR4 и связанных с ним рецепторов.

Эксперименты *in vitro* выполнены на клетках моноцитов человека линии

U-937. Полученные результаты свидетельствовали о количественных, качественных и временных различиях синтеза TNF- α и IFN- γ под влиянием ЛПС и ЛПС-МТ. Выяснили, что динамика синтеза цитокинов соответствует ответу синергизированного TLR4 с выраженным агонистическим/антагонистическим эффектом. Пик совместного функционирования Toll-рецепторов максимален в пределах 4 часов, затем их действие уменьшается. Активация сигнальных путей TLR4 под влиянием ЛПС и ЛПС-МТ существенно отличается. Синтез IFN- γ под влиянием ЛПС37 происходит приблизительно с одинаковой скоростью и достигает максимального значения через 20 часов. ЛПС37-МТ, напротив, индуцирует синтез IFN- γ в максимальном количестве в течение первых 60 минут, затем экспрессия генов уменьшается, и через 20 часов синтез IFN- γ отсутствует. Профиль цитокинового ответа MyD88-зависимого пути для ЛПС37 и ЛПС37-МТ идентичен, однако интенсивность синтеза TNF- α под влиянием ЛПС37-МТ в два раза больше по сравнению с исходной формой ЛПС37. Следовательно, конформационно измененная форма ЛПС37 супрессирует TRIF-путь передачи сигнала и усиливает активность фактора ядерной транскрипции провоспалительных цитокинов [5, 7].

В качестве контроля в опытах использовали препараты ЛПС *E. coli* S- и R-хемотипов, характер цитокинового ответа которых известен: для S-ЛПС типично доминирование MyD88-зависимого пути передачи сигнала над TRIF-зависимым. ЛПС R-хемотипа активирует одновременно оба пути при незначительном сдвиге в сторону MyD88-зависимого [21]. В условиях наших экспериментов количество синтезированных TNF- α и IFN- γ под влиянием ЛПС37 и R-ЛПС *E. coli* одинаково, а ЛПС37-МТ, как и S-ЛПС *E. coli* индуцируют преимущественно синтез только одного класса цитокинов — TNF- α .

Сходство профилей цитокиновых ответов (ЛПС37 с R-ЛПС *E. coli*, а ЛПС37-МТ с S-ЛПС *E. coli*) позволило предположить, что передача сигнала TLR4 от ЛПС37 и ЛПС37-МТ идет разными путями, подобно тому, как этот процесс происходит у S- и R-форм ЛПС *E. coli* [10, 21]. В пользу высказанного предположения свидетельствуют результаты опытов по рестимуляции TLR4 моноцитов человека.

Процесс рестимуляции заключается в повторном воздействии ЛПС на известный рецептор, предварительно активированный специфическим для него лигандом. В зависимости от степени идентичности химической структуры лигандов, используемых для первичной и повторной активации Toll-рецепторов, цитокиновый ответ клетки может быть супрессирован или, напротив, усилен. В опытах по рестимуляции первичную активацию моноцитов проводили R- или S-ЛПС *E. coli*. Результаты экспериментов показали, что характер цитокинового ответа моноцитов при воздействии ЛПС37 и ЛПС37-МТ различен и существенно зависит от того, какая из форм ЛПС *E. coli* (R или S) была использована для первичной активации TLR4.

Полученные результаты четко демонстрируют два известных эффекта, наблюдаемых при рестимуляции TLR4 гомологичным или же гетерологичным ЛПС — супрессию MyD88-зависимого пути гомологичным лигандом и down-/up-регуляцию сигнальных путей под влиянием ЛПС с иной химической структурой. При этом первичный сигнал MyD88-зависимого пути, вызванный R-ЛПС *E. coli*, супрессируется ЛПС37 *Y. pestis* 231, а первичный ответ S-ЛПС *E. coli* подавляется ЛПС37-МТ *Y. pestis* 231. Примечательно то, что регуляторные действия ЛПС37 и ЛПС37-МТ противоположно направлены: ЛПС37 переключает сигнал на TRIF-путь (синтез IFN- γ), в то время как ЛПС37-МТ переключает сигнал на MyD88-зависимое направление (синтез TNF- α) [5].

Результаты экспериментов, полученные при прямой и повторной активации моноцитов, свидетельствуют о том, что ЛПС37 исходной и конформационно измененной формы ЛПС37-МТ *Y. pestis* 231 дифференцированно активируют сигнальные пути TLR4 и имеют различный механизм их регуляции.

Модельные эксперименты по рестимуляции в условиях *in vitro* лишь отчасти воспроизводят эффект иммунологического взаимодействия многофакторной системы макроорганизма в целом. Наиболее близким аналогом процесса рестимуляции *in vivo* является феномен эндотоксинальной толерантности, который заключается в подавлении воспалительного ответа на сигнал ЛПС при повторной активации иммунных клеток эндотоксином.

В клинической практике это явление известно как иммуносупрессия, наблюдаемая на поздних стадиях сепсиса при токсикоинфекциях. В опытах на волонтерах и лабораторных животных выяснено, что воспроизведение данного феномена существенно зависит от ряда факторов: химической структуры ЛПС, используемых в работе; доз препаратов ЛПС, вводимых при первичной и повторной активации иммунных клеток; последовательности введения ЛПС и от промежутка времени между инъекциями. С целью повышения чувствительности животных к действию ЛПС повторную обработку животных обычно проводят препаратами ЛПС, соединенными с D-галактозамином, увеличивающим их токсичность в сотни раз [18].

Сведения о толерантности биопробных животных к ЛПС *Y. pestis* в литературе отсутствовали. Поэтому для воспроизведения этого феномена все вышеуказанные параметры были подобраны экспериментально. Показателем корректности подобранных условий постановки опытов являлось отсутствие гибели животных в случае, когда для первичной и повторной активации использовались препараты ЛПС одинакового химического строения (гомоторантность).

Эффект эндотоксинальной толерантности оценивали для ЛПС37, ЛПС37-МТ *Y. pestis* 231 и R- и S-форм ЛПС *E. coli*. Экспериментальная сетка включала 16 вариантов постановки опытов с учетом всех возможных сочетаний четырех препаратов ЛПС при первичной и повторной активации. Такие перекрестные сочетания позволяли судить о степени идентичности молекулярных механизмов действия исследуемых ЛПС в условиях *in vivo*.

В этих опытах выяснено, что толерантность мышей к действию ЛПС37 и комплекса ЛПС37-МТ вирулентного штамма *Y. pestis* 231 различна. При сочетании ЛПС37 *Y. pestis* с гетерологичными S- и R-формами ЛПС *E. coli* или ЛПС37-МТ *Y. pestis* воспалительный ответ организма варьирует от полной или частичной толерантности до ее отсутствия. Для комплекса ЛПС37-МТ принципиальным является исключительно последовательность введения препаратов ЛПС биопробным животным. В случае, когда первичная активация проводится ЛПС37-МТ, а повторная — ЛПС37 *Y. pestis* или S- и R- формами ЛПС *E. coli*, эффект толерантности отсутствует. Напротив, если ЛПС37-МТ используется для повторной активации на фоне всех иных форм ЛПС включая ЛПС37 *Y. pestis* 231, воспалительный ответ полностью подавлен, то есть ЛПС-МТ в условиях макроорганизма проявляет свойства универсального иммуносупрессора [1, 2].

Установленный факт согласуется с результатами экспериментов по цитокининдуцирующей активности двух форм ЛПС, а также позволяет объяснить влияние последовательности введения ЛПС на характер иммунного ответа организма. Полагаем, что в случае, когда первая обработка животных проводится комплексом ЛПС37-МТ, для которого TRIF-зависимый путь является доминантным, негативный контроль регуляции ингибирует именно эту систему передачи сигнала. При этом MyD88-зависимый путь не блокируется и при повторном воздействии ЛПС

сигнал беспрепятственно проводится MyD88-зависимой системой, активирует NF- κ B и индуцирует синтез провоспалительных цитокинов.

Напротив, если первичная активация иммунных клеток макроорганизма вызывается препаратами ЛПС, для которых MyD88-зависимое направление является доминантным, на этапе торможения ингибируется передача сигнала этого пути. В этом случае повторная обработка животных ЛПС37-МТ *a priori* предполагает эффект толерантности, так как для реализации воспалительного ответа на действие ЛПС37-МТ необходимо переключение сигнала от TRIF- к MyD88-зависимому пути, активность которого блокирована.

Таким образом, иммуномодулирующие свойства ЛПС37-МТ, выявленные нами в опытах *in vitro*, валидны результатам, полученным в условиях *in vivo*. Опыты по толерантности подтверждают различия иммуномодулирующих свойств ЛПС37 и комплекса ЛПС37-МТ *Y. pestis* 231 в условиях макроорганизма и указывают на особый механизм контроля воспалительного ответа.

Анализ полученных нами экспериментальных данных позволил составить общую схему передачи сигнала TLR4/MD2 моноцитов человека под воздействием ЛПС37 и ЛПС37-МТ *Y. pestis* 231 (рис. 1, 2). Приведенные схемы наглядно демонстрируют принципиальные различия иммуномодулирующих свойств между исходными и конформационно измененными формами ЛПС.

Установлено, что обе формы ЛПС активируют TLR4 моноцитов человека, индуцируя одновременный синтез цитокинов двух типов — TNF- α и IFN- γ . Профиль цитокинового ответа соответствует совместному действию TLR4 — TLR2. При этом TLR2 играет основную регуляторную роль в проведении сигналов как по MyD88-зависимому, так и по TRIF-пути. Активация TLR4 исходной формой ЛПС характеризуется слабо выраженной активностью обеих сигнальных систем с незначительным доминированием MyD88-зависимого пути. По мере активации TLR2 увеличивается синтез TNF- α и наблюдается переключение сигнала от MyD88-зависимой к TRIF-проводящей системе. Затем, когда возбуждение TLR2

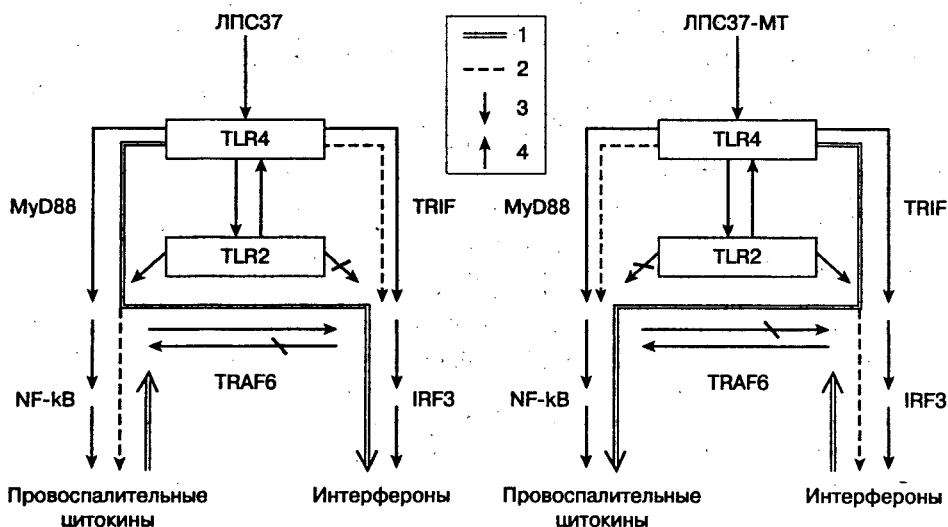


Рис. 1 (слева). Схема передачи сигнала TLR4/MD2 под воздействием ЛПС37 *Yersinia pestis* 231.

Здесь и на рис. 2: 1 — доминантный путь передачи сигнала; 2 — дополнительный путь передачи сигнала; 3 — позитивная регуляция передаваемого сигнала; 4 — негативная регуляция передаваемого сигнала.

Рис. 2 (справа). Схема передачи сигнала TLR4 / MD2 под воздействием ЛПС37-МТ *Yersinia pestis* 231.

проходит, синтез TNF- α снижается до первоначального уровня, в то время как синтез IFN- γ продолжает увеличиваться под контролем TLR4. Для ЛПС-МТ характерна иная закономерность. Возбуждение TLR4 сопровождается быстрой и сильной активацией TRIF-сигнального пути на фоне незначительной активности MyD88-зависимой. Возбуждение TLR2 приводит к полной ингибции активности TRIF-пути с одновременным переключением сигнала на MyD88-зависимое направление и резким увеличением синтеза TNF- α . Таким образом, для обеих форм ЛПС характерна кросс-регуляция передаваемого сигнала. При этом переключение сигнала между MyD88-зависимым и TRIF-путями противоположно направлено: для исходной формы ЛПС доминантная активность MyD88-зависимого пути реализуется повышенным синтезом IFN- γ , в то время как для ЛПС-МТ доминантность TRIF-пути приводит к увеличению синтеза TNF- α . Различия позитивного/негативного контроля активности TLR4 под влиянием исходной и конформационно измененной форм ЛПС подтверждены в опытах по эндотоксиновой толерантности на животных.

Обращает на себя внимание тот факт, что доминантность сигнальных путей и их кросс-регуляция под воздействием изучаемых форм ЛПС зеркально противоположны, поэтому ЛПС37 и ЛПС37-МТ инициируют синтез цитокинов различных типов — исходная форма ЛПС активирует фактор ядерной транскрипции синтеза интерферонов, а конформационно измененная форма ЛПС активирует фактор ядерной транскрипции провоспалительных цитокинов.

Различия в цитокининдуцирующей активности и путях передачи сигнала исходных и конформационно модифицированных форм ЛПС *Y. pestis* 231 соответствуют иммунному ответу организма на каждой стадии инфекционного процесса: поздний воспалительный ответ по интерфероновому типу характерен для внутриклеточного цикла развития чумы, а на стадии септического шока при массивном размножении бактерий в тканях паренхиматозных органов макроорганизма наблюдается гиперпродукция воспалительных цитокинов. Две ступени модификации ЛПС — температурозависимое изменение химической структуры ЛПС с последующим изменением конформации молекул ЛПС под воздействием факторов макро- и микроорганизмов — отражают специфику и, возможно, уникальность действия эндотоксина возбудителя чумы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Демидова Г. В., Зюзина В. П., Соколова Е. П., Пасюкова Н. И., Беспалова И. А., Бородина Т. Н., Тынянова В. И. Эндотоксиновая толерантность к липополисахаридам вакцинного и вирулентного штаммов *Yersinia pestis* в условиях *in vivo*. Проблемы ООИ. 2012, 3 (313): 61-63.
2. Зюзина В. П., Демидова Г. В., Соколова Е. П., Пасюкова Н. И., Беспалова И. А., Бородина Т. Н., Тынянова В. И. Эндотоксиновая толерантность белых мышей к действию липополисахарида и комплекса липополисахарид-«мышинный» токсин вирулентного штамма *Yersinia pestis* 231. Журн. микробиол. 2013, 5: 74-80.
3. Кравцов А. Н., Тынянова В. И., Зюзина В. П. Повышение вирулентности бактерий *Yersinia pestis* при инкубации клеток в гемолизированных эритроцитах крови человека. Журн. микробиол. 1993, 4: 3-6.
4. Соколова Е. П., Марченков В. И., Демидова Г. В. и др. Комплексы «мышинного» токсина чумного микроба с модифицированными формами липополисахарида *Yersinia pestis* и с липополисахаридами других бактерий. Биотехнология. 2001, 4: 53-58.
5. Соколова Е. П., Демидова Г. В., Зюзина В. П. и др. Токсичность и цитокининдуцирующая активность ЛПС вирулентного штамма *Y. pestis* 231. Журн. микробиол. 2011, 6: 20-26.
6. Соколова Е. П., Демидова Г. В., Зюзина В. П., и др. Динамика синтеза TNF- α и IFN- γ

- моноцитами человека под действием липополисахаридов *Yersinia pestis* EV 76 с различной степенью токсичности. Журн. микробиол. 2010, 4: 59-64.
7. Соколова Е. П., Демидова Г. В., Зюзина В. П. и др. Исследование цитокининдуцирующей активности различных форм липополисахаридов *Yersinia pestis* EV76 моноцитами человека. Известия высших учебных заведений. Северо-Кавказский регион. Естеств. науки. 2012, 2: 75-78.
 8. Таболин В.А., Яковлев М.Ю., Ильина А.Я. и др. Патогенетические механизмы и клинические аспекты действия термостабильного эндотоксина кишечной микрофлоры. Русский медицинский журнал. 2003, 1: 126-128.
 9. Тынянова В.И., Зюзина В.П., Демидова Г.В. и др. Гликолипид — биоактиватор токсических субстанций чумного микроба. Биотехнология. 1999, 2: 28-33.
 10. Huber M., Kalis C., Keck S. et al. R-form LPS, the master key to the activation of TLR4/MD-2-positive cells. Eur. J. Immunol. 2006, 36 (3): 701-711.
 11. Kawahara K., Tsukano H., Watanabe H. et al. Modification of the structure and activity of lipid A in *Yersinia pestis* lipopolysaccharide by growth temperature. Infect. Immun. 2002, 70 (8): 4092-4098.
 12. Knirel Y.A., Linder B., Vinogradov E.V. et al. Temperature dependent variations and intraspecies diversity of the structure of the lipopolysaccharides of *Yersinia pestis*. Biochemistry. 2005, 44: 1731-1743.
 13. Knirel Y. A., Anisimov A. P. Lipopolysaccharide of *Yersinia pestis*, the cause of plague: structure, genetics, biological properties. Acta Nature. 2012, 4 (13): 45-58.
 14. Matsuura M., Takahashi H., Watanabe H. et al. Immunomodulatory properties of *Yersinia pestis* lipopolysaccharides on human macrophages. Clin. Vaccine Immunol. 2010, 17 (1): 49-55.
 15. Montminy S., Khan N., McGrath S. et al. Virulence factors of *Yersinia pestis* are overcome by a strong lipopolysaccharide response. Nature Immun. 2006, 7 (10): 1066-1073.
 16. Sato S., Nomura F., Kawai T. et al. Synergy and cross-tolerance between toll-like receptor (TLR) 2-and TLR4-mediated signaling pathways. J. Immunol. 2000, 165: 7096-7101.
 17. Schromm A., Brandenburg K., Loppnow H. et al. The change of endotoxin molecules influences their formation and IL-6 inducing capacity. J. Immunol. 1998, 161: 5464-5471.
 18. Silverstein R. D-galactosamine lethality model scope and limitations. J. Endotoxin Res. 2004, 10 (3): 147-162.
 19. Rebeil R., Ernst K. E., Clayton O. J. et al. Characterization of late acyltransferase genes of *Yersinia pestis* and their role in temperature-dependent lipid A variation. J. Bacteriol. 2006, 188 (4): 1381-1388.
 20. Telepnev M. V., Klímpel G. R., Haithcoat J. et al. Tetraacylated lipopolysaccharide of *Yersinia pestis* can inhibit multiple toll-like receptor mediated signaling pathways in human dendritic cells. J. Infect. Dis. 2009, 200: 1694-1702.
 21. Zughair S. M., Zimmer S. M., Datta A. et al. Differential induction of the Toll-like receptor 4-MyD88-dependent and -independent signaling pathways by endotoxins. Infect. Immun. 2005, 73 (5): 2940-2950.

Поступила 20.12.15

Контактная информация: Тынянова Виктория Ивановна, к.б.н.,
3440002, Ростов-на-Дону, ул. М. Горького, 117, р. т. (862) 240-27-03