

УДК 616-002:579.842.15

## ИССЛЕДОВАНИЕ ЗАЩИТНЫХ СВОЙСТВ БИОПОЛИМЕРОВ УГЛЕВОДНОЙ ПРИРОДЫ *SHIGELLA SONNEI* НА МОДЕЛЯХ ЭНДОТОКСИЧЕСКОГО ШОКА

А.А. Маркина, И.А. Кондратьева

(кафедра иммунологии; e-mail: markinanna@mail.ru)

Проведено исследование толерогенных свойств нового апирогенного, низкоэндотоксичного комплексного препарата на основе биополимеров углеводной природы *Shigella sonnei* на D-галактозаминовой и прямой моделях эндотоксического шока. Профилактическое введение препарата защищает мышей (СВА × С57Bl/6)F1 от гибели при введении летальных доз эндотоксина *E. coli* O:55. На прямой модели эндотоксического шока было показано, что повышение дозы иммунизации коррелирует с увеличением выживаемости и снижением уровня ФНО- $\alpha$  в сыворотках крови экспериментальных животных.

**Ключевые слова:** эндотоксический шок, экзополисахарид, липополисахарид, *Shigella sonnei*, эндотоксическая толерантность, ФНО- $\alpha$ .

Сепсис, обусловленный действием грамотрицательных бактерий, является одной из причин развития серьезных осложнений при хирургических вмешательствах, а также при травмах и ожогах. Несмотря на применение антибиотиков последнего поколения, обладающих широким спектром действия, и высокотехнологичных методов лечения сепсис остается патологическим состоянием, ассоциированным с высоким уровнем летальности, которая при септическом (эндотоксическом) шоке достигает 50% [1]. Неэффективность иммунотерапии на фоне септических состояний и при хирургических вмешательствах диктует необходимость разработки новых подходов не только к лечению сепсиса, но и к предотвращению, профилактике, подготовке пациента к возможному септическому состоянию.

Эндотоксический шок развивается при попадании бактериального эндотоксина (липополисахарида, ЛПС) — компонента клеточной стенки грамотрицательных бактерий — в организм в чистом виде, деструктивная роль которого заключается в массированной выработке провоспалительных цитокинов, прежде всего ФНО- $\alpha$  и ИЛ-1 $\beta$  [2, 3]. Их чрезмерная продукция обуславливает запуск патологических процессов, характерных для сепсиса: генерализация воспаления, повреждение эндотелия сосудов, активация коагуляции и снижение фибринолиза. Эти нарушения могут привести к развитию синдрома диссеминированного внутрисосудистого свертывания крови, гипоксии тканей и, как следствие, к повреждению тканей и органной дисфункции [4], которая в совокупности с устойчивой гипотензией приводит к развитию эндотоксического (септического) шока.

В последние годы была сформулирована концепция иммунопрофилактики эндотоксического шока, направленная на разработку противошоковых вакцин

с использованием биополимеров углеводной природы (БУП), применение которых позволяет создать рефрактерность (устойчивость) организма к последующему массивному попаданию бактериального эндотоксина. Несмотря на важность проблемы, количество работ по профилактике эндотоксического шока ограничено, так как связано в том числе и с использованием ЛПС, уровень эндотоксичности которого не позволяет использовать его в клинической практике [5].

В настоящем исследовании мы проводили оценку принципиальной возможности коррекции эндотоксического шока при профилактической иммунизации мышей (СВА × С57Bl/6)F1 новым апирогенным низкоэндотоксичным комплексным препаратом на основе БУП *S. sonnei* — экзополисахарида (ЭПС) и нативного (0,1% по массе), обладающего полноценной эндотоксической активностью, ЛПС с использованием экспериментальных моделей эндотоксического шока.

### Методы

**Модель эндотоксического шока  
на мышах (СВА × С57Bl/6)F1,  
сенсибилизованных D-галактозамином.**

Мышам (СВА × С57Bl/6)F1 (филиал “Андреевка” НЦБМТ РАМН, Россия) весом 20–22 г вводили внутрибрюшинно (в/б) комплексный препарат (ЭПС + ЛПС) *S. sonnei* в разных дозах (0,1; 1; 10 или 25 мкг/мышь) за 12 ч до введения 0,1 мкг стандартного эндотоксина *E. coli* O:55 (Sigma-Aldrich, США) (далее — ЛПС *E. coli* O:55) совместно с 15 мг D-GalN (Alfa Aesar, Германия) в 0,5 мл 0,9%-го раствора хлорида натрия (физраствор). Группу контрольных мышей составили особи, которым вводили в/б 0,5 мл

физраствора за 12 ч до введения D-галактозамина и ЛПС *E. coli* O:55 в тех же дозах, что и иммунизированным животным.

### **Прямая модель эндотоксического шока**

Мышам (СВА × С57Б1/6)F1 в/б вводили летальную дозу 2 мг/мышь ЛПС *E. coli* O:55 без сенсибилизаторов через 72 ч после их в/б иммунизации комплексным препаратом (ЭПС + ЛПС) *S. sonnei* в дозах 100, 200 или 400 мкг/мышь в 0,5 мл физраствора. Группу контрольных мышей составили особи, которым вводили в/б 0,5 мл физраствора за 72 ч до введения 2 мг ЛПС *E. coli* O:55.

Содержание ФНО- $\alpha$  в сыворотках крови интактных и иммунизированных комплексным препаратом (ЭПС + ЛПС) *S. sonnei* мышей определяли с помощью тест-системы Quatikine Mouse TNF  $\alpha$ /TNFSF1A (R&D Systems, США) методом твердофазного иммуноферментного анализа согласно стандартной методике производителя. Кровь для анализа брали через 90 мин [6] после индукции эндотоксического шока по методу, описанному выше.

### **Результаты и обсуждение**

#### **Профилактика эндотоксического шока при предварительном введении комплексного препарата (ЭПС + ЛПС) *S. sonnei***

Изучение протективных свойств комплексного препарата (ЭПС + ЛПС) *S. sonnei* непосредственно от патологического действия ФНО- $\alpha$  *in vivo* проводили на модели эндотоксического шока с использованием сенсибилизатора эндотоксичности — D-галактозамина (D-GalN). Клетки печени участвуют в процессах элиминации ЛПС из кровотока, детоксикации ЛПС и в продуцировании медиаторов воспаления в ответ на присутствие эндотоксина в кровотоке [7]. D-GalN истощает запасы уридинтрифосфата в печени, в результате чего нарушается синтез мембранных гликопротеинов, гликогена, что приводит к повреждению и гибели гепатоцитов и клеток Купфера, печень утрачивает защитную функцию и, как следствие, понижается порог чувствительности организма мышей не только к ЛПС, но и к ФНО- $\alpha$  [8], который играет решающую роль в гибели мышей при введении D-GalN/ЛПС [9] за счет специфичного апоптоза гепатоцитов и острой печеночной недостаточности [10].

При профилактической иммунизации мышей в дозах 0,1; 1; 10 или 25 мкг/мышь комплексный препарат (ЭПС + ЛПС) *S. sonnei* обеспечивал 100% выживаемость животных при индукции эндотоксического шока с применением D-GalN. В течение первых 24 ч гибель контрольных мышей составила 100%. Защитное действие комплексного препарата, с учетом механизма действия D-GalN, связано с подавлением синтеза ФНО- $\alpha$  в печени.

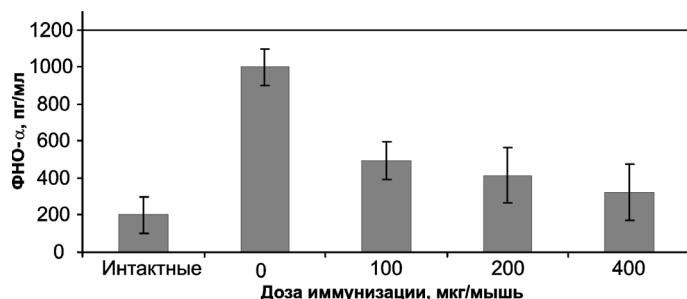
Прямая модель эндотоксического шока воспроизводит такой важный патогенетический аспект клинического течения шока, как массированное поступление (выброс) бактериального эндотоксина в организм больного за счет введения летальной дозы ЛПС *E. coli* O:55, составляющей 150 мг/кг. Первичная умеренная активация клеток при низких дозах эндотоксина позволяет создать невосприимчивость к массированному (в летальных дозах) вторичному попаданию ЛПС в организм. Данный феномен получил название эндотоксической толерантности. Использование ЛПС грамотрицательных бактерий в качестве агента для коррекции эндотоксического шока основано на феномене ранней эндотоксической толерантности, в основе которой лежит блокирование связывания бактериального эндотоксина с TLR4 рецепторами или нарушение передачи сигнала от рецепторного комплекса TLR4/MD-2 и продукции провоспалительных цитокинов [11]. Ранняя эндотоксическая толерантность неспецифична и развивается через 3–4 дня после введения эндотоксина [5], поэтому толерогенное действие препарата оценивали по выживаемости животных в течение 3 дней после введения ЛПС *E. coli* O:55 (таблица).

**Выживаемость мышей (СВА × С57Б1/6)F1 на прямой модели эндотоксического шока при иммунизации препаратом (ЭПС + ЛПС) *S. sonnei***

Доза препарата (мкг/мышь)	Количество мышей	Гибель мышей (часы)			% выживаемости
		0–24	24–48	48–72	
400	10	0	0	0	100
200	10	1	0	0	90
100	10	2	2	0	60
Контроль (0 мкг)	10	8	2	—	0

Выживаемость животных, иммунизированных комплексным препаратом в дозе 400 мкг/мышь, составила 100%. Иммунизация в дозах 200 и 100 мкг к исходу 3-х сут обеспечила соответственно 90 и 60% уровня выживаемости мышей. Гибель контрольной группы к исходу 2-х сут составила 100%. Полученные данные показывают, что введение препарата (ЭПС + ЛПС) *S. sonnei* защищает животных от последующего введения эндотоксина в летальной дозе, причем была выявлена зависимость доза–эффект: повышение дозы иммунизации коррелирует с увеличением выживаемости животных.

С использованием прямой модели эндотоксического шока было установлено, что развитие сепсиса происходит в результате острого воспалительного процесса в ответ на быструю массивную продукцию цитокинов: при введении эндотоксина экспериментальным животным или добровольцам у последних отмечают жар, тахикардию и системные симптомы воспаления, которые совпадают по времени с пиком ФНО- $\alpha$  в сыворотке [12], а возрастание концентра-



Уровень ФНО- $\alpha$  в крови мышей (СВА × С57Б1/6)F1 через 90 мин после введения эндотоксина *E. coli* O:55 на прямой модели эндотоксического шока при иммунизации препаратом (ЭПС + ЛПС) *S. sonnei*

ции ФНО- $\alpha$  в сыворотке коррелирует с гибелью пациентов от грамотрицательного сепсиса [13]. Поэтому помимо выживаемости животных на прямой модели эндотоксического шока мы параллельно контролировали уровень ФНО- $\alpha$  в сыворотках периферической крови у интактных и толеризированных мышей. Предварительная иммунизация препаратом (ЭПС + ЛПС) *S. sonnei* обеспечивала снижение продукции ФНО- $\alpha$  макрофагами *in vivo* до уровня ниже 500 пг/мл, в то время как уровень ФНО- $\alpha$  в группе контроля составил более 1000 пг/мл (рисунок).

Зарегистрированная нами при введении комплексного препарата (ЭПС + ЛПС) *S. sonnei* понижающая регуляция уровней ФНО- $\alpha$  ниже 400 пг/мл достаточна для обеспечения 100% выживаемости мышей линии (СВА × С57Б1/6)F1 при индукции эндотоксического шока, вызванного введением массивных количеств эндотоксина *E. coli* O:55 до 150 мг/кг.

Ранняя эндотоксическая толерантность характеризуется снижением продукции провоспалительных

цитокинов мононуклеарными фагоцитами в ответ на повторное введение ЛПС [14]. ФНО- $\alpha$  является маркером эндотоксической толерантности, так как при повторном введении ЛПС толерогенным мышам наблюдается резкое падение уровня ФНО- $\alpha$  по сравнению с быстрым и мощным ростом концентрации последнего при первичном введении ЛПС [15]. Таким образом, угнетение выработки ФНО- $\alpha$  при эндотоксическом шоке является положительным прогностическим признаком исхода заболевания, а эндотоксическая толерантность представляет собой защитный механизм, снижающий степень воспалительного ответа, и ассоциируется с увеличением резистентности и защиты тканей от повреждения и гибели экспериментальных животных.

## Выходы

При профилактической иммунизации мышей (СВА × С57Б1/6)F1 комплексным препаратом (ЭПС + ЛПС) *S. sonnei* нами впервые были зарегистрированы эффекты профилактики течения моделируемого в эксперименте эндотоксического шока. Несмотря на низкую эндотоксичность, комплексный препарат обладает мощным толерогенным действием, защищая экспериментальных животных от гибели за счет понижающей регуляции продукции ФНО- $\alpha$  на фоне эндотоксического шока, индуцируемого введением летальной дозы эндотоксина *E. coli* O:55, составляющей 150 мг/кг. Полученные результаты позволяют сделать вывод, что эффект при профилактическом введении препарата (ЭПС + ЛПС) *S. sonnei* был обеспечен феноменом ранней эндотоксической толерантности.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Cross A.S., Opal S.M., Warren H.S., Palardy J.E., Glaser K., Parejo A., Bhattacharjee A.K. Active immunization with a detoxified *Escherichia coli* J5 lipopolysaccharide group B meningococcal outer membrane protein complex vaccine protects animals from experimental sepsis // *J. Infect. Dis.* 2001. N 183. P. 1079–1086.
- Astiz M.E., Rackow E.C. Septic shock // *Lancet*. 1998. N 361. P. 1501–1505.
- Dinarello C. Cytokines as mediators in the pathogenesis of septic shock // *Curr. Topics Microbiol. Immunol.* 1996. N 216. P. 133–165.
- Ulloa L., Tracey K.J. The “cytokine profile”: a code for sepsis // *Trends Mol. Med.* 2005. N 11. P. 56–63.
- Madonna G.S., Peterson J.E., Ribi E.E., Vogel S.N. Early-phase endotoxin tolerance: induction by detoxified lipid A derivative, monophosphoryl lipid A // *Infect. Immun.* 1986. N 52. Vol. 1. P. 6–11.
- Dinarello C.A. Immediate cytokine responses to endotoxin: tumor necrosis factor  $\alpha$  and interleukin-1 family // *Endotoxin in Health and Disease* / Ed. H. Brade. New York: Marcell Dekker, 1999. P. 817–830.
- van Amersfoort E.S., van Berkel T.J., Kuiper J. Receptors, mediators, and mechanisms involved in bacterial sepsis and septic shock // *Clin. Microbiol. Rev.* 2003. N 16. Vol. 3. P. 379–414.
- Lehmann B.V., Freudenberg M.A., Galanos G. Lethal toxicity of lipopolysaccharide and tumor necrosis factor in normal and D-galactosamine-treated mice // *J. Exp. Med.* 1987. N 165. P. 657–663.
- Tiegs G., Wolter M., Wendel A. Tumour necrosis factor is a terminal mediator in galactosamine/endotoxin-induced hepatitis in mice // *Biochem. Pharmacol.* 1989. N 38. P. 627–631.
- Mignon A., Rouquet N., Fabre M., Martin S., Pages J.C., Dhainaut J.F., Kahn A., Briand P., Joulin V. LPS challenge in D-galactosamine-sensitized mice accounts for caspase-dependent fulminant hepatitis, not for septic shock // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 1999. N 159. P. 1308–1315.
- Johnston C.A., Greisman S.E. Mechanism of endotoxin tolerance // *Handbook of Endotoxin*. Vol. 2. Pathophysiology of endotoxin / Ed. L.B. Hishaw. New York: Elsevier, 1985. P. 359–391.
- Suffredini A.F., Reda D., Banks S.M., Tropea M., Agosti J.M., Miller R. Effects of recombinant dimeric TNF- $\alpha$  receptor on human inflammatory responses following intravenous endotoxin administration // *J. Immunol.* 1995. N 155. P. 5038–5045.

13. Marano M.A., Fong Y., Moldawer L.L., Wei H., Calvano S.E., Tracey K.J., Barie J.S., Manogue K., Cerami A., Shires G.T.G., Lowry S.F. Serum cachectin/tumor necrosis factor in critically ill patients with burns correlate with infection and mortality // Surg. Gynecol. Obstet. 1990. N 170. P. 32—38.
14. Christman J.W., Lancaster L.H., Blackwell T.S. Nuclear factor  $\kappa$ B: a pivotal role in the systemic inflammatory response syndrome and new target for therapy // Intens. Care Med. 1998. N 24. P. 1131—1138.
15. Schade F.U., Flach R., Flohé S., Majetschak M., Kreuzfelder E., Dominguez-Fernandes E., Borgermann J., Reutter M., Obertacke U. Endotoxin tolerance // Endotoxin in Health and Disease / Ed. H. Brade. New York: Marcel Dekker, 1999. P. 751—767.

Поступила в редакцию  
15.05.12

## INVESTIGATION OF PROTECTIVE PROPERTIES OF *SHIGELLA SONNEI* CARBOHYDRATE BIOPOLYMERS UNDER EXPERIMENTAL ENDOTOXIC SHOCK MODELS

*A.A. Markina, I.A. Kondratieva*

Study tolerogenic properties of new non-pyrogenic low-endotoxic complex preparation composed of *Shigella sonnei* carbohydrate biopolymers under D-galactosamine and direct experimental endotoxic shock models. Pretreatment with complex preparation protects mice (CBA × C57Bl/6)F1 against lipopolysaccharide (*E. coli* O:55) — mediated death. We demonstrate correlation between increasing pre-immunization dose of complex preparation with rate of survival and reduction of TNF- $\alpha$  serum level under direct endotoxic shock model.

**Key words:** *endotoxic shock, exopolysaccharide, lipopolysaccharide, Shigella sonnei, endotoxin tolerance, TNF- $\alpha$ .*

### Сведения об авторе

*Маркина Анна Александровна* — мл. науч. сотр. лаборатории полисахаридных вакцин ФГБУ “ГНЦ Института иммунологии” ФМБА России. Тел.: 8-909-931-61-25, 8-499-618-67-83; e-mail: markinanna@mail.ru  
*Кондратьева Ирина Анатольевна* — канд. биол. наук, доц. Международного учебно-научного биотехнологического центра. Тел.: 8-926-247-74-53; e-mail: kondratieva9@gmail.com