

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«БАШКИРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

Медико-профилактический факультет с отделением биологии
Кафедра фундаментальной и прикладной микробиологии

На правах рукописи

Саньчиков Дмитрий Владимирович

КОЛИЧЕСТВЕННАЯ ОЦЕНКА СОДЕРЖАНИЯ
ЛИПОПОЛИСАХАРИДОВ В КЛЕТОЧНОЙ СТЕНКЕ
ГРАМОТРИЦАТЕЛЬНЫХ БАКТЕРИЙ РАЗЛИЧНЫХ ВИДОВ

Научный руководитель:

зав. кафедрой ФПМ, д.м.н, профессор

А.Р. Мавзютов

Уфа – 2022

ОГЛАВЛЕНИЕ

Список сокращений и условных обозначений	4
ВВЕДЕНИЕ	5
Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	8
1.1. Липополисахариды грамотрицательных бактерий: молекулярная структура, химическая природа, токсичность	7
1.2. Биологические эффекты бактериальных липополисахаридов	13
1.3. Методы экстракции бактериальных липополисахаридов из клеточных стенок бактерий	19
1.4. Методы определения бактериальных липополисахаридов	26
1.4.1. Экспериментальное выявление пирогенных субстанций в крови	27
1.4.2. ЛАЛ-тест	27
1.4.3. PyroGene™	30
1.4.4. EndoZyme® и EndoLisa®	31
1.5. Endotoxin Activity Assay	31
1.6. Метод активированных частиц (МАЧ) Endotox	32
Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	34
2.1. Объекты исследования	33
2.2. Приготовление селективных и дифференциально-диагностических питательных сред	33
2.3. Приготовление разведений культур микроорганизмов	35
2.4. Экстракция липополисахаридов из клеточных стенок бактериальных клеток	36
2.5. Проведение ЛАЛ-теста	38
Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ	40
3.1. Экстракция липополисахаридов из клеточных стенок бактериальных клеток	40
3.2. Модификация условий культивирования тестируемых штаммов микроорганизмов	42

3.3. Сравнительный анализ содержания ЛПС у разных видов бактерий с помощью ЛАЛ-теста	48
ВЫВОДЫ	50
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	51
ПРИЛОЖЕНИЕ	

Список сокращений и условных обозначений

LB-среда – бульон Лурия-Бертани (по Миллеру)

ЕАА-тест – Endotoxin Activity Assay Test

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ЛАЛ-тест – Limulus Amebocyte Lysate Test

ЛПС – липополисахариды

МАЧ-Endotox – метод активированных частиц Endotox

О-ПС – О-полисахаридная цепь

ПААГ – полиакриламидный гель

РНК – рибонуклеиновая кислота

ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность исследования. На сегодняшний день достаточно подробно изучена структура липополисахаридов (ЛПС) грамотрицательных бактерий. В достаточном количестве исследований [6,17,18,42] раскрыто строение бактериального эндотоксина, основными структурными компонентами которого являются О-антиген, определяющий видовые и серологические особенности микроорганизма, олигосахаридное ядро, являющееся высокомолекулярным соединением с характерной консервативной структурой, и бифосфорилированный липид (липид А), являющийся наиболее консервативной частью молекулы ЛПС, которая выполняет основную роль в развитии токсического эффекта [9,41,42]. Для ЛПС грамотрицательной микрофлоры описан целый ряд биологических эффектов на макроорганизм, среди которых присутствуют как положительные, так и отрицательные факторы.

ЛПС как неизменные структурные компоненты клеточной стенки грамотрицательных бактерий, биологические эффекты которых реализуются в результате лизиса бактериальных клеток, известны как индукторы системных воспалительных реакций [43,44]. Иммунотропные препараты микробного происхождения, получаемые на основе ЛПС грамотрицательных бактерий, называемые сейчас также иммуномодуляторами, получили в последнее время достаточно широкую популярность. Эти препараты обладают преимущественно десенсибилизирующим и противовоспалительным действием, повышают как общую, так и специфическую резистентность макроорганизма, а также воздействуют на работу клеточного и гуморального иммунитета [3,11].

В связи с этим вопрос совершенствования методик получения фракций ЛПС в достаточном количестве весьма актуален и решение его необходимо в первую очередь для изучения ЛПС-обусловленных

биологических эффектов, а также для разработки новых подходов к иммунотерапии.

Цель исследования. Подбор оптимальных условий выделения ЛПС из культур грамотрицательных бактерий с максимально возможным выходом бактериальных ЛПС.

Задачи исследования

1. Сбор и анализ информации о биологических эффектах ЛПС и перспективах их практического применения в медицине и биологии.
2. Формирование коллекции культур для дальнейшего использования в качестве потенциальных суперпродуцентов ЛПС.
3. Выбор метода, обеспечивающего наибольший выход ЛПС.
4. Сравнительная оценка содержания ЛПС в клеточных стенках у бактерий разных видов.
5. Оценка влияния изменений условий культивирования на выход ЛПС из культур бактерий *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* и *Staphylococcus aureus*.

Практическая значимость.

Разработан высокоэффективный и высокопроизводительный метод получения чистого препарата ЛПС из клеточной стенки *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* и *Staphylococcus aureus*, освобожденного от большей части контаминирующих высокомолекулярных органических соединений.

Отобраны штаммы-кандидаты для препаративного выделения ЛПС.

На основании полученных экспериментальных данных определены оптимальные условия культивирования штаммов-суперпродуцентов для препаративного выделения ЛПС.

Область применения результатов исследования.

Предложенный способ препаративного выделения ЛПС из клеточной стенки бактерий в перспективе может быть использован для получения субстанций ЛПС и/или его фракций на биотехнологических и

фармацевтических предприятиях для производства иммуномодулирующих препаратов.

ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Липополисахариды грамотрицательных бактерий: молекулярная структура, химическая природа, токсичность

Детальное изучение молекулярной структуры, биологической активности и антигенных свойств ЛПС началось в первой половине XX века. Первыми работами в данной области стали труды немецкого бактериолога и иммунолога R. Pfeiffer, который исследовал механизмы патогенеза холеры на морских свинках с использованием холерного вибриона *Vibrio cholerae*. В ходе своих экспериментов он не обнаружил наличия типичного экзотоксина, который был описан у других микроорганизмов, однако им была выделена термостабильная субстанция, которая при введении животным вызывала шок. Поскольку данная субстанция могла быть получена только путем лизиса бактерий, в противовес уже тогда известным экзотоксинам R. Pfeiffer стал обозначать ее как «эндотоксин» [59]. Именно благодаря относительной простоте получения эндотоксина данный компонент лизата грамотрицательных бактерий оказался изучен значительно лучше, чем бактериальные экзотоксины.

Биохимическая формула эндотоксина была расшифрована в 1952 г. группой ученых O. Westphal и O. Luderitz, которые также приравнивали между собой понятия «эндотоксин» и «липополисахарид» (ЛПС).

ЛПС представляет собой комплекс с молекулярной массой от 2 до 20 kDa и состоит из нескольких компонентов (рисунок 1):

1. O-антиген - последовательность повторяющихся полисахаридных цепей, предопределяющих видовые и серологические особенности микроорганизма,
2. олигосахаридное ядро - высокомолекулярное соединение с характерной консервативной структурой, включающее

компоненты различных по химической природе внешней (D-глюкоза, D-галактоза, N-ацетил-глюкозамин) и внутренней (β-глицеро-О-манно-гептоза, 2-кето-3-дезоксид-β-манно-октулозоновая кислота) части ядра,

3. бифосфорилированный липид (липид А) – наиболее консервативная часть молекулы ЛПС, выполняющая основную роль в развитии токсического эффекта [39,40,65].

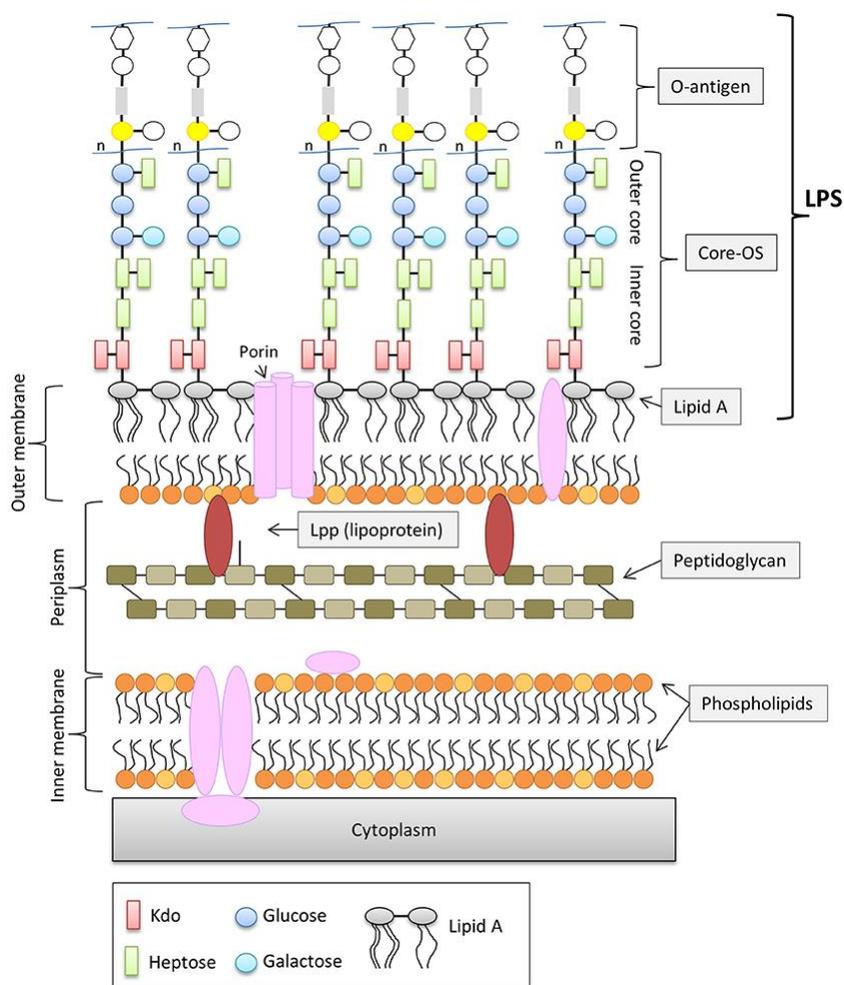


Рисунок 1 - Молекулярная модель внутренней и внешней мембран *Escherichia. coli* BW25113 [20].

Токсичность ЛПС определяется непосредственно наличием О-антигена и липида А. О-антиген представляет собой линейный или разветвленный гетерополисахарид, построенный из повторяющихся 20-40

олигосахаридов. Компонентами цепи могут быть также моносахариды неуглеводной природы [10,15]. Строение О-цепей предопределяет гетерогенность конкретного полисахарида и основные свойства ЛПС. Липид А, в свою очередь, обладает максимальной токсичностью для клеток человека, являясь ответственным звеном в развитии целого ряда патофизиологических процессов в организме хозяина [45,76], и представляет собой фосфорилированный дисахарид, который построен из двух остатков глюкозамина, несущих остатки высших жирных кислот и соединенных между собой по гидроксильным группам и аминогруппам. Наличие этих остатков, а точнее их расположение и ориентация перпендикулярно внешней мембране, способствует формированию упорядоченного компактного наружного слоя, который непроницаем для гидрофобных молекул (например, антибиотиков) [23]. Помимо этого, в ряде исследований [4,47] для липида А была описана адьювантная и митогенная активность, а также участие в активации фагоцитоза путем активации комплемента и макрофагов.

Олигосахаридное ядро (core) как относительно стабильная часть ЛПС представлено большим олигосахаридом, состоящим примерно из 10-12 кислых или нейтральных моносахаридных остатков. Благодаря особенностям строения молекулы ЛПС core задействован в формировании биологически активной конформации липида А, за счет чего становится возможным проявление всех биологических эффектов данного компонента ЛПС [23,38]. Присутствие как в core, так и в липиде А отрицательно заряженных групп позволяет ЛПС связывать на поверхности мембраны катионы двухвалентных металлов, которые также задействованы в сохранении её целостности [8].

Стоит заметить, что у разных видов микроорганизмов (или штаммов одного вида микроорганизма) длина цепи О-антигена варьирует в достаточно широких пределах. Например, ЛПС видов *Salmonella typhimurium* и *Salmonella minnesota* содержат группы О-

антигенсодержащих молекул с полисахаридными цепями, имеющими по данным гель-электрофореза 70, 15-25 и 1 повторяющееся звено. Для вида *Salmonella abortus equi* характерно наличие двух таких популяций с О-антигеном, который построен из 25-45 и 1-8 повторяющихся звеньев [61].

Аналогично варьирует от одного вида к другому (от штамма к штамму) содержание молекул S-формы, для которой свойственно наличие длинных и коротких цепей, а также доля молекул, в которых core замещен полисахаридной цепью. Например, у энтеробактерий доля S-формы ЛПС составляет примерно 80%, в то время как *Pseudomonas aeruginosa* она достигает не более 15% [10].

В зависимости от наличия или отсутствия отдельных компонентов в молекуле ЛПС выделяют [21,37,54]:

1. S-ЛПС - характерно наличие в структуре ЛПС липида А, полисахарида, включающего О-антиген, и центрального олигосахарида (core),
2. R-ЛПС - характерно наличие в структуре ЛПС липида А и центрального олигосахарида (кора), О-антиген - отсутствует,
3. Re-ЛПС - характерно наличие в структуре ЛПС липида А (в структуре содержится 1-2 остаток 2-кето-3-дезоксооктоновой кислоты), полисахарида, включающего О-антиген, и центрального олигосахарида (core),
4. Ra-ЛПС, Rd1-ЛПС, Rb1-ЛПС, Rc-ЛПС - характерно наличие в структуре ЛПС липида А, полисахарида, включающего О-антиген, и центрального олигосахарида (core) с характерными нарушениями в строении олигосахаридов внутренней и внешней ядерной частей.

Все структурно-функциональные части молекулы ЛПС (О-антиген, олигосахаридное ядро (core) и липид А) содержат в своем составе антигенные детерминанты, против которых направлена специфичная иммунная реакция в ответ на действие определенного антигена, присущего

тому или иному микроорганизму. Согласно данным, представленным в работах группы исследователей [20,57], центральный олигосахарид и О-антиген содержат в своем составе специфические антигенные детерминанты, которые узнаваемы бактериофагами. Подобное различие между видами (или штаммами) может быть положено в основу внутривидовой классификаций микроорганизмов – фаготипирования.

Как уже было выше сказано, гетерогенность и серологическая специфичность ЛПС обусловлена, главным образом, структурой О-полисахаридной цепи и в соответствии с этим выделяют:

1. S-формы бактерий – содержатся молекулы с различной длиной полисахаридной цепи (в среднем до 50 единиц),
2. R-формы бактерий – содержатся молекулы ЛПС, лишенные полисахаридных цепей,
3. SR-формы бактерий - содержатся молекулы ЛПС, О-антиген которых представлен одним повторяющимся звеном.

Гетерогенность ЛПС может быть наглядно продемонстрирована с помощью электрофореза в полиакриламидном геле (ПААГ) в присутствии, например, додецилсульфата натрия. Фракционирование и специфическое окрашивание ПААГ серебром позволяет получить характерную картину «лесенки», характеризующейся серией полос с различной интенсивностью окраски. Нижняя часть электрофореграммы - подвижные молекулы ЛПС, содержащие только комплекс «олигосахаридный core + липид А» (R-форма ЛПС), средняя часть – ЛПС, содержащие короткие О-полисахаридные цепи (SR- и S-формы) и верхняя часть (наиболее низкая степень подвижности молекул ЛПС) - ЛПС, содержащие длинные О-полисахаридные цепи [7,14].

Поскольку относительное содержание молекул S-формы и длина цепи О-антигена напрямую влияют на протективную и серологическую активность ЛПС, осуществление контроля гетерогенности препаратов

ЛПС является важным этапом при подборе наиболее оптимальной методики экстракции ЛПС [25]. Например, при выделении ЛПС из бактериальной биомассы S-штаммов по методу O. Westphal с использованием водного фенола выделяются ЛПС преимущественно с длинными O-антигенными цепями. В то время как использование методов, связанных с использованием ЭДТА, дает препараты с высоким содержанием молекул с короткими полисахаридными цепями [57]. Для получения молекул ЛПС у R-штаммов, лишенных цепей O-антигена, используют метод Galanos C. С использованием смеси веществ фенол - хлороформ - петролейный эфир.

1.2. Биологические эффекты бактериальных липополисахаридов

Основным физиологическим источником ЛПС в организме человека является микрофлора кишечника, кожных покровов, слизистых оболочек дыхательных путей, а также полости рта. Кишечник является основным «физиологическим» резервуаром ЛПС и оказывает непосредственное влияние на процесс формирования врожденного «эндотоксинового иммунитета». Известно, что концентрация эндотоксина в крови варьирует от 0 до 1,0 EU/ml, причем поступление в кровь преимущественно дробное, а элиминация опосредована системой макрофагов печени [47, 48].

Взаимодействие эндотоксина с клетками-мишенями обеспечивается благодаря вырабатываемому гепатоцитами ЛПС-связывающему протеину (LBP), который содержится в крови в микроколичествах – в нормальных условиях не более 10 мкг/мл-1. Протеин LBP наряду с рецепторными молекулами CD14 и TLR4/MD-2 участвует в процессе рецепторного пути распознавания бактериального ЛПС. Известно, что указанные звенья повсеместно экспрессируются на лимфоцитах, моноцитах, макрофагах, эндотелиальных и эпителиальных клетках [4,47].

Попадание в системный кровоток молекул ЛПС сопровождается протеканием следующих реакций:

1. выработка биологически активных молекул различной природы (фактор активации тромбоцитов, простагландины, лейкотриены, интерлейкины, интерфероны и т.д.) в результате активации системы фагоцитов – макрофагов, лейкоцитов и др.;

2. связывание молекул ЛПС с протеином, транспортирующим ЛПС на мембраны моноцитов и нейтрофилов, являющихся клетками-мишенями;

3. передача ЛПС на CD 14, не имеющего, в свою очередь, эндоплазматического домена, и затем передача сигнала на комплекс TLR4/MD-2;

4. активация целого ряда специфичных белков: TIR-содержащего адаптерного белка (TIRAP), фактора дифференцировки миелоидов MyD88, TIR-содержащей адаптерной молекулы (TRIF), а также TRIF-родственной адаптерной молекулы (TRAM);

5. конечная активация ядерного фактора КаппаВ (NFκB) и интерферонрегулирующего фактора 3 (IRF3).

Патогенные свойства ЛПС проявляются в зависимости от реактивности иммунной системы организма, а также индивидуальных предрасположенностей к тем или иным заболеваниям, и характеризуются наличием лихорадки, лейкоцитоза (или лейкопении) и аутоагрессии [11,34,73]. Факторами, предопределяющими результат воздействия ЛПС на организм, являются реактивность и иммунологическая толерантность организма, а также его аффинность к рецепторам ЛПС. Также немало важными факторами являются концентрация и длительность воздействия самого эндотоксина.

К основным биологическим свойствам ЛПС, лежащим в основе патогенеза различных заболеваний, следует отнести пирогенность, токсичность, способность ЛПС активировать каскад реакций в

метаболизме жирных кислот и тем самым оказывать повреждающее действие на эндотелий сосудов, а также способствовать интенсивной выработке белков острой фазы. Очень часто результатом такого воздействия ЛПС на организм является интоксикация вторичными продуктами метаболизма внутренних органов и, как результат, формирование полиорганной недостаточности, возникающей на фоне нарушения проницаемости гематоинтестинального барьера, а также стимуляция системы фагоцитов и массового выброса медиаторов [36,63].

Характер и интенсивность клеточного ответа напрямую зависит от концентрации эндотоксина в крови индивидуума. Согласно последним литературным данным относительно низкие концентрации ЛПС способствуют деструктивным процессам в тканях органов, средние концентрации очень часто являются предикторами развития системного воспалительного ответа и лихорадки, а высокие концентрации ЛПС становятся причиной эндотоксинового шока. В литературных источниках [16,36], к примеру, указано, что концентрации ЛПС, достигающие значений 0,01 мкг/л, способствуют гибели клеток путем апоптоза, тогда как увеличенные до 1,0 мкг/л дозы ЛПС оказывают разрушительное действие на клетки, вызывая выраженные некротические изменения.

Уже достаточно давно доказана иммуномодулирующая активность бактериальных ЛПС [12,48], которая заключается в непосредственном воздействии эндотоксинов на иммунную систему макроорганизма, выражающегося в активации ряда иммунологических факторов и выбросе медиаторов воспаления - хемокинов, цитокинов, эйкозамидов и др., выработка которых является неотъемлемым этапом в процессе развития патофизиологических изменений.

Группой исследователей продемонстрирована иммуностимулирующая активность фракции ЛПС *E. coli* M17 на фагоцитарную и метаболическую активность нейтрофилов крови мышей с индуцированным иммунодефицитом [68]. Имеются сведения о влиянии

липолисахаридов, выделенных из культуры *Sinorhizobium meliloti*, на гемопоэз по типу иммуномодуляторов вследствие значимого повышения количества лимфоцитов при индуцированном иммунодефиците [68]. ЛПС грамотрицательных бактерий имеют важное медицинское значение, в том числе при сепсисе γ -интерферона (IFN- γ) и гранулоцито-макрофагально-колониестимулирующего фактора (GM-CSF) [30]. Исследования по данной теме имеют ряд трудностей, связанных экспериментальным моделированием, однако использование отдельных фракций липополисахаридов, демонстрирующих сходную с цельными ЛПС грамотрицательных бактерий биологическую активность, но не являющихся токсичными, позволит их решить.

Результатами ряда научных исследований [13,49,51] был продемонстрирован дозозависимый эффект бактериальных ЛПС на ряд клеток иммунной системы, в частности, стало известно, что макрофаги в ответ на действие эндотоксина становятся толерантными к его последующему воздействию и в дальнейшем проявляют сильно измененный ответ на эндотоксинемию.

Иммуотропные препараты микробного происхождения, получаемые на основе ЛПС грамотрицательных бактерий, часто называют иммуномодуляторами, которые в свою очередь можно условно разделить на 3 поколения. Препараты, представляющие собой липополисахариды бактериального происхождения, относят преимущественно в группу препаратов I поколения (например, продигиозан - липополисахарид, выделенный из микроорганизма *Bacillus prodigiosum*; пирогенал – липополисахаридный комплекс, выделенный из клеток *Salmonella typhi*). Эти препараты обладают десенсибилизирующим и противовоспалительным действием, повышают как общую, так и специфическую резистентность макроорганизма, воздействуют на работу клеточного и гуморального иммунитета, а также влияют на терморегулирующие центры гипоталамуса. В связи с вышесказанным

становится очевидным, что ЛПС является достаточно удобным инструментом для эффективной коррекции нарушений иммунных состояний человека, поскольку именно они участвуют в формировании специфического иммунного ответа хозяина в ответ на проникновение чужеродного агента.

На сегодняшний день приобрели большую популярность препараты, содержащие ЛПС грамотрицательных бактерий, которые характеризуются достаточно обширным спектром положительных эффектов на организм. К примеру, помимо активной стимуляции иммунной защиты путем активации Toll-подобных рецепторов дендритных клеток, бактериальные ЛПС напрямую задействованы в процессах регенерации тканей, в том числе нервной и мышечной [5,50].

В эксперименте группы ученых [1] на крысах была продемонстрирована выраженная гепатопротективная активность ЛПС грамотрицательных бактерий, и также описан механизм действия подобных препаратов - пирогенала, сальмозана, продигиозана, лизоцима, пирексаля, пиромена и др. По полученным данным удалось убедиться в эффективности перечисленных выше лекарственных веществ, в частности был продемонстрирован гепатопротективный эффект продигиозана, маннана и лизоцима в результате постоянного введения животным. Среди этих препаратов лишь несколько нашли применение в клинической гепатологии - продигиозан и пирогенал, одним из главных преимуществ которых является инволюция цирроза печени.

На сегодняшний день продигиозан чаще всего используется как ранозаживляющее средство, чуть реже как препарат для лечения вирусных гепатитов А и В. Положительные эффекты продигиозана при проведении терапии, следующие:

- 1) улучшение общего состояния пациента;
- 2) восстановление аппетита;
- 3) уменьшение интоксикации;

- 4) укорочение продолжительности манифестной стадии заболевания.

Использование пирогенала в лечении хронического гепатита и цирроза печени сопровождается:

- 1) исчезновением слабости, утомляемости и диспептических явлений;
- 2) улучшением эмоционального состояния пациентов;
- 3) улучшением показателей пигментного обмена и холестеринобразующей функции печени;
- 4) активизацией пероксидазной системы;
- 5) усилением фагоцитоза;
- 6) улучшением проницаемости и трофики печёночной ткани.

Положительная динамика наблюдалась и при применении пирогенала при гепатозе у крыс, вызванном отравлением CCl_4 . Помимо выше указанных положительных эффектов от медикаментов добавлялись ещё несколько:

- 1) стимулирование синтеза различных жизненно необходимых белков;
- 2) нормализация активности ферментов в сыворотке крови и ткани печени;
- 3) мобилизация гликогена в гепатоцитах.

Также существуют данные о том, что лечение сочетанной патологии «хронический гепатит В / хронический гепатит С + алкогольный гепатит» инъекциями пирогенала приводит к активации клеток клеточного иммунитета, а также стимуляции бактерицидной и противовирусной активности [24,60]. Лечение хронического гепатита В у детей пирогеналом значительно повышает эффективность терапии и способствует

нормализации кининогенеза, тем самым стимулируя активность сериновой протеазы калликреина и усиливая синтез прекалликреина [32].

1.3. Методы экстракции бактериальных липополисахаридов из клеточных стенок бактерий

На сегодняшний день для подробного выяснения химической природы, а также изучения молекулярной организации и иммунохимических свойств бактериальных ЛПС разработано достаточное количество методов выделения очищенных препаратов. Рассмотрим наиболее часто используемые методики экстракции ЛПС из клеточной стенки бактерий.

Наиболее известным методом, послужившим основой для большинства других методик, является водно-фенольный способ получения ЛПС, который включает следующие этапы:

- обработка микробной массы водно-фенольной смесью при 65°C в течение 45 мин.;
- охлаждение смеси и разделение центрифугированием;
- диализ водной фазы в течение 3-4 суток против дистиллированной воды для удаления фенола;
- осаждение ЛПС ультрацентрифугированием при 100 000 g, 15°C и в течение 3 ч.

Известен способ горячей водно-фенольной экстракции ЛПС из микробных клеток возбудителя холеры штамма *Vibrio cholerae* 569 В. В процедуру очистки препарата ЛПС включен неионный детергент Тритон Х-114, использование которого сокращает время очистки препарата от примесей нуклеиновых кислот и препятствует неблагоприятному действию лиофильной сушки. Метод воспроизводится благодаря проведению следующих процедур:

- выращивание культуры штамма *Vibrio cholerae* 569 В на казеиновом агаре (рН 7,6) 18 часов при 37°C;
- смыв культуры с поверхности питательной среды с использованием стерильного 0,9%-ного раствора NaCl (рН 7,2);
- добавление к полученной взвеси свежеперегнанного фенола до конечной концентрации 1% и выдерживание смеси в течение 18 часов при температуре 37°C;
- проверка полученной биомассы на стерильность и отсутствие неспецифического роста;
- центрифугирование и отмывка микробных клеток сначала стерильным 0,9 %-ным раствором NaCl (рН 7,2), а затем дистиллированной водой;
- лиофилизация полученного микробного препарата;
- суспендирование в равных объемах воды и фенола при 68°C в течение 15 мин;
- центрифугирование полученной эмульсии в течение 30 мин при 3000 об/мин после охлаждения до 10°C;
- отделение фенольного слоя от водного и повторная обработка нерастворимого остатка дистиллированной водой;
- объединение водных экстрактов и проведение диализа с целью удаления фенола (при необходимости освобождения от нерастворимых соединений в диализат при постоянном перемешивании добавляют неионный детергент Тритон Х-114 до конечной концентрации 6%);
- разделение фаз в полученном растворе сначала на водяной бане (37°C), а затем при центрифугировании в течение 5 мин при 6000-8000 об/мин при температуре в центрифуге выше 25°C;
- удаление верхнего слоя (водной фазы) и смешивание маслянистого слоя (фаза детергента), образовавшегося на дне

- пробирки, с 1%-ным водным раствором Тритона X-114 в соотношении 1:3 на холоду (0-4°C) с целью полного удаления полимерных соединений, в том числе нуклеиновых кислот;
- осаждение бактериальной ЛПС из очищенной детергентной фазы подкисленным ацетоном в соотношении 1:6;
 - центрифугирование полученного осадка, промывка в ацетоне, растворение в дистиллированной воде и лиофилизация полученной биомассы.

Запатентованный в 2004 г. группой авторов [56] способ выделения ЛПС из бактериальных клеток также получил широкое распространение в связи с возможностью получения препарата, максимально очищенного от примесей высокомолекулярных соединений, в том числе от SDS. Основные этапы процедуры экстракции:

- экстракция буферным раствором, представляющим собой смесь растворов - ЭДТА (0.01-0.05 ммоль на 1 г влажных клеток), 0.1 ммоль фенилметансульфонилфторид и 1% детергент Тритона X-100);
- центрифугирование с целью отделения экстракта от интактных бактериальных клеток;
- депротеинизация протеиназой К до конечной концентрации 80 мкг/мл;
- инкубация готовой смеси в течение 60 мин при температуре 56-60°C.

Большой практический интерес представляет способ, позволяющий изменять иммуномодулирующие свойства ЛПС чумного микроба в условиях *in vitro*. Метод подразумевает адаптированную методику получения очищенных препаратов бактериальных ЛПС и «мышинного» токсина (МТ) *Yersinia pestis*, и дальнейшее образование их комплекса -

ЛПС-МТ, «мишенью» которого являются цитокины TNF- α и IFN- γ , а точнее активация их синтеза [75].

Способ включает следующие этапы:

- подготовка опытной пробы: смешивание 5 мкг ЛПС (50 мкл из рабочего разведения 100 мкг/мл) и 50 нг МТ (5 мкл из рабочего разведения 10 мкг/мл), инкубация пробы при 37°C в течение 30 мин;
- добавление 100 мкл NaCl;
- внесение полученной смеси в полистироловый планшет, в лунках которого содержатся культура клеток моноцитов человека – линия U-937 в количестве 1×10^6 клеток на лунку; перед этим культуру клеток предварительно культивируют в среде PRMI 1640 с одновременной постановкой двойного контроля;
- проведение количественного учёта синтезированных цитокинов с экспозицией 1, 4, 20 часов с использованием коммерческой тест-системы (Вектор-Бест, Новосибирск);
- анализ полученных данных на предмет изменения иммуномодулирующих свойств ЛПС *Yersinia pestis*.

Существует способ выделения биологически активной фракции, содержащей S-ЛПС из ГОБ [53]. Метод состоит из 4 этапов:

- экстракция суспензии (содержит бактериальные клетки, продукты их жизнедеятельности, лизаты) горячим водным фенолом по Вестфалю, диализ, отделение нерастворимого материала и лиофилизация;
- ферментативная очистка (рибонуклеаза, дезоксирибонуклеаза, протеиназа К) промежуточного продукта от примесей высокомолекулярных соединений (белки, нуклеиновые кислоты), диализ, лиофилизация;

- ультрацентрифугирование промежуточного продукта фракционирование путем экстракции смесью хлороформ - метанол - водный HCl 1:1:0,4-0,5, затем на выбор или же использование в комплексе других методов (гель-электрофорез в ПААГ, колоночная хроматография, гель-проникающая хроматография, ультрафильтрация);
- диализ, гель-хроматография и получение готового конечного продукта.

Также известен способ экстракции R-формы ЛПС с использованием смеси фенол-хлороформ-петролейный эфир. Первоначально бактериальную культуру трижды суспензируют в смеси 90% фенол-хлороформ-петролейный эфир соотношении 2:5:8, затем смесь перемешивают в течение 15 минут, при этом постоянно охлаждая полученную смесь, далее центрифугируют 15 мин при 5000 g. Затем для того, чтобы удалить хлороформ и петролейный эфир из надосадочной жидкости смесь выдерживают на роторном испарителе при 40°C. Далее к очищенной от хлороформа и петролейного эфира смеси добавляют по каплям дистиллированную воду до момента выпадения ЛПС в видимый осадок. На следующем этапе удаляют фенол из полученного раствора путем добавления в раствор 6-кратного объема охлажденной смеси серного эфира и ацетона.

Также существует метод водно-фенольной экстракции бактериальных ЛПС [2] с сопутствующей очисткой от высокомолекулярных соединений, в частности нуклеиновых кислот, путем обработки детергентом Тритон X-114 при 0°C и осаждения холодным ацетоном.

Указанные выше методики и их аналоги имеют существенный недостаток - используемый в процедуре выделения ЛПС фенол достаточно сильно влияет на молекулярную организацию и биологические свойства

эндотоксина. Также фенол можно охарактеризовать как летучее, агрессивное и достаточно вредное для человека соединение, в связи с чем был разработан целый ряд щадящих методик, предусматривающих исключение вредных факторов и основанных на предварительном лизисе бактерий с последующими этапами – депротеинизацией протеазами и обработкой нуклеазами.

Известен метод экстракции ЛПС по Darveau, отличающийся своей дороговизной, а также трудоемкостью осуществления:

- обработка суспензии микробных клеток панкреатическими нуклеазами (ДНК-аза, РНК-аза);
- деструкция обработанных клеток продавливанием их через French-press;
- обработка промежуточной суспензии микробных клеток панкреатическими нуклеазами (ДНК-аза, РНК-аза);
- обработка раствором, содержащим ЭДТА и SDS, с целью разрушения молекулярных связей;
- двукратная депротеинизация материала проназой;
- осаждение этанолом и лиофилизация.

Также известен метод выделения ЛПС из бактериальных клеток, состоящий всего из нескольких этапов, в ходе которых получают готовые для дальнейших исследований препараты ЛПС. Основные этапы проведения экстракции по указанному методу:

- кипячение бактериальной суспензии в течение 10 мин в лизирующем буфере 1М Трис-НСl рН 6.8 (содержит 2% SDS и 4% меркаптоэтанола);
- обработка протеиназой К в течение 60 мин при температуре 56-60°C.

Применяемый на первом этапе выделения SDS существенно осложняет процедуру очистки готового препарата ЛПС, поскольку является трудноудаляемым компонентом и, соответственно, снижающим качество готового препарата ЛПС. Одним из эффективных решений данного вопроса стал запатентованный группой авторов [56] способ выделения ЛПС из бактериальных клеток с ориентировкой на максимальное очищение готового препарата от примесей, в том числе от SDS. Основные этапы процедуры экстракции:

- экстракция буферным раствором, представляющим собой смесь растворов - ЭДТА (0.01-0.05 ммоль на 1 г влажных клеток), 0.1 ммоль фенилметансульфонилфторид и 1% детергент Тритона X-100);
- центрифугирование с целью отделения экстракта от интактных бактериальных клеток;
- депротеинизация протеиназой К до конечной концентрации 80 мкг/мл;
- инкубация готовой смеси в течение 60 мин при температуре 56-60°C.

Следующий известный метод получения ЛПС, в частности конкретно для эндотоксинов возбудителя чумы - *Yersinia pestis* [70]. Способ включает следующие этапы выделения:

- предварительная водно-солевая обработка суспензии бактериальных клеток;
- лизис буфером (0,1 М Трис-HCl pH 8.0, 10 ммоль ЭДТА, 1% Тритон X-100);
- деструкция бактериальных клеток ультразвуком;
- обработка протеовибрином (160 мкг/мл) и инкубация при 37°C, pH 7.8-8.0 в течение 18 ч.;

- добавление ледяной уксусной кислоты до pH 3.2-3.4 для очистки от нуклеиновых кислот и последующее осаждение при 5000 g в течение 30 мин.

Для получения чистой фракции ЛПС *Chlamydia trachomatis* была предложена следующая методика [74]:

- экстракция ЛПС из бактериальных клеток 90%-ным водным раствором фенола при 50°C;
- отделение надосадочной жидкости центрифугированием и разведение 0,1 М трис-HCl буфером в соотношении 1:9;
- выделение ЛПС методом аффинной хроматографии на конканавалин-A-сефарозе 4В;
- промывка 1 М раствором NaCl, забуференным трис-HCl буфером;
- элюция 0,4-0,45 М раствором N-ацетил-D-глюкозамина в трис-HCl буфере, диализ и лиофилизация.

1.4. Методы определения бактериальных липополисахаридов

На сегодняшний день существуют следующие способы выявления ЛПС бактерий:

- экспериментальное выявление пирогенов, в том числе ЛПС, на лабораторных животных – кроликах;
- ЛАЛ тест (Limulus Amebocyte Lysate Test) и его аналоги – PyroGene™, EndoLisa® и EndoZyme® — лабораторные тесты для выявления бактериальных эндотоксинов;
- ЕАА (Endotoxin activity assay) — аналитический метод определения активности эндотоксина в цельной крови;
- МАЧ-Endotox (метод активированных частиц) — полуколичественный метод лабораторного определения

суммарного содержания ЛПС в цельной крови, а также концентрации эндотоксинов отдельных видов бактерий.

1.4.1. Экспериментальное выявление пирогенных субстанций в крови

Метод лабораторного определения наличия ЛПС в крови был предложен в 1942 г. Фармакопеей США и заключался в выявлении пирогенности в ходе проведения теста на кроликах. Главным недостатком метода считалась невозможность количественной оценки содержания бактериальных эндотоксинов [66].

Определение пирогенности той или иной субстанции заключалось во введении тестируемого раствора в кровь лабораторных животных и наблюдении за изменениями в температуре тела. Положительным результатом считалось повышение температуры тела животных выше допустимой нормы, что подтверждало факт наличия в крови пирогенных примесей.

1.4.2. ЛАЛ-тест

ЛАЛ-тест (*Limulus Amebocyte Lysate, LAL*) — метод качественного и количественного определения уровней ЛПС в различных жидкостях (в том числе в крови и плазме), предложенный ещё в 1968 г. и основанный на реакции *in vitro* между бактериальным эндотоксином и ЛАЛ-реактивом. В 1985 г. метод был включен в Фармакопею США как способ определения бактериальных эндотоксинов [26].

Одним из преимуществ ЛАЛ-теста, в отличие от экспериментального выявления пирогенных субстанций в крови кроликов, является возможность ранжировать различные виды бактерий в зависимости от активности их ЛПС.

Суть метода заключается в реакции фермента фактора С, содержащегося в лизате амебоцитов мечехвостов *Limulus polyphemus* (ЛАЛ-реагент). Для данного фермента характерна «избирательность», поскольку он реагирует только с бактериальными эндотоксинами и таким образом запускает каскад ферментативных реакций, в ходе которых происходит модификация субстрата, выявляемая различными способами в зависимости от той или иной модификации ЛАЛ-теста [66].

Рассмотрим модификации ЛАЛ-теста:

1. гель-тромб тест — недорогой и не требующий дополнительного оборудования метод полуколичественного анализа образцов на предмет наличия ЛПС, основанный на формировании твердого геля после добавления ЛАЛ-реактива к исследуемому образцу;
 - чувствительность метода (предел обнаружения ЛПС) - от 0,01 до 0,03 ЕЭ/мл, где 1 ЕЭ соответствует 100 пг БЭ;
 - положительный результат анализа – образование плотного геля на дне пробирки, сохраняющего целостность при переворачивании;
 - отрицательный результат анализа – отсутствие геля / мгновенное разрушение при переворачивании пробирки.

2. хромогенный ЛАЛ-тест – высокопроизводительный метод определения бактериальных эндотоксинов, основанный на образовании окрашенного продукта желтого цвета при гидролизе субстрата ввиду активации ферментной системы, при этом интенсивность окрашивания раствора прямо пропорциональна содержанию ЛПС; возможно получение количественных данных за счет построения калибровочной прямой по данным, полученным в ходе анализа;
 - чувствительность метода (предел обнаружения ЛПС) - 0,005 ЕЭ/мл;

- необходимое дополнительное оборудование - стандартный спектрофотометр или оптический ридер для измерения оптической плотности растворов в планшетах.
- 3. турбодиметрический ЛАЛ-тест – лабораторный метод, отличающийся наибольшей чувствительностью по сравнению с другими модификациями ЛАЛ-теста и основанный на взаимодействии реактива с бактериальными эндотоксинами; результатом такой реакции является изменение оптической плотности и, как следствие, помутнение раствора, время изменения мутности раствора может быть экстраполировано на исходное количество эндотоксина;
 - чувствительность метода (предел обнаружения ЛПС) - 0,001 ЕЭ/мл;
 - необходимое дополнительное оборудование - термостатирующий инкубатор с встроенным фотометром, позволяющим непрерывно измерять оптическую плотность реакционной смеси в условиях термостатирования.

Анализ биологических жидкостей может быть затруднен в связи с присутствием в них компонентов, напрямую ингибирующих реакцию связывания с субстратом. К возможным ингибиторам реакции можно отнести белок LBP, поверхностные структуры тромбоцитов, а также молекулы CD11/CD18, CD14 и т.д. [34,52]. Эти соединения способны связываться с ЛПС, нейтрализовать их и, таким образом, снижать точность определения количества эндотоксинов в исследуемых образцах. Аналогичными свойствами характеризуются сериновые протеазы и (1,3)- β -D-глюканы, которые катализируют гидролиз пептидных связей ферментов и участвуют в каскаде реакций [62,64]. Большое количество протеаз с одной стороны может подавлять ход реакции и делать определение ЛПС

проблематичным, а с другой стороны может стимулировать систему свертывания крови мечехвостов и, таким образом, приводить к получению ложноположительных результатов. Для снижения получения ложноположительных результатов при исследовании биоматериала (цельная кровь, сыворотка крови) рекомендуется использовать буфер Glucashield™, который совместим с реагентом для ЛАЛ-теста. Использование такого раствора позволяет повысить точность определения ЛПС за счёт изменения свойств ферментов, участвующих в реакции – она становятся нечувствительны к (1,3)-β-D-глюканам.

Основные преимущества ЛАЛ-теста:

- высокие чувствительность и воспроизводимость;
- нетрудоёмкость;
- сравнительно невысокая стоимость;
- удобство применения.

Основные недостатки ЛАЛ-теста:

- недостаточно высокая специфичность при анализе содержания бактериальных эндотоксинов в биологическом материале;
- острая необходимость в дополнительном оборудовании.

1.4.3. PyroGene™

Лабораторный метод определения ЛПС в различных жидкостях, основанный на использовании набора PyroGene™ (Lonza), является аналогом классического ЛАЛ-теста, однако является более специфичным в отношении выявления именно бактериальных эндотоксинов [71,72]. Суть метода заключается в том, что вместо нативной формы фактора С гемостаза мечехвостов используют рекомбинантные молекулы фактора С (rFC), которые активируются при связывании с эндотоксинами, что

приводит к эмиссии флуоресцентного сигнала. В ходе проведения такого анализа исключено получение ложноположительных результатов. Чувствительность метода – 0,005 ЕЭ/мл. Главные недостатки - высокая стоимость и проблема приобретения на территории РФ.

1.4.4. EndoZyme® и EndoLisa®

Метод EndoZyme® применяется для количественного определения ЛПС в различных жидкостях и основывается на взаимодействии ЛПС с рекомбинантными молекулами фактора С (rFC) [46]. В ходе проведения реакции регистрируется флуоресцентный сигнал. Чувствительность метода – 0,005 ЕЭ/мл.

Другой способ определения ЛПС - метод EndoLisa®, который является модификацией метода EndoZyme® и отличается от него лишь в наличии стадии предварительного концентрирования эндотоксинов при помощи рекомбинантного белка бактериофага, который закреплен на полимерной подложке. Детекция результатов происходит при помощи ферментной системы, содержащей молекулы rFC.

1.5. Endotoxin Activity Assay — EAA

EAA (Endotoxin Activity Assay, EAA) – лабораторный метод, предложенный в 1998 году для определения активности эндотоксина в цельной крови с целью диагностики грамтрицательной бактериальной инфекции [19]. EAA метод позволяет в достаточно короткие сроки (не более 30 мин) определять бактериальные эндотоксины в 10 мл крови без трудоемкой процедуры пробоподготовки.

EAA-тест заключается в протекании следующих реакций:

- связывание эндотоксина в крови с антиэндотоксиновыми антителами – моноклональными IgM мыши и образование комплекса АГ-АТ;
- взаимодействие комплекса АГ-АТ с рецепторами факторов комплемента, экспрессирующими на поверхности нейтрофилов;
- «респираторный взрыв» нейтрофилов под воздействием глюкана зимозана А и выделение большого количества высокореактогенных молекул-окислителей, детектируемых методом люминолзависимой хемилюминесценции; интенсивность люминесценции пропорциональна количеству эндотоксина, присутствующего в образце крови.

Ограничения ЕАА теста:

- использование исключительно цельной крови для исследования;
- необходимость дополнительного специализированного дорогостоящего оборудования, позволяющего проводить необходимую обработку образцов крови, а также ридеров для регистрации хемилюминесцентного сигнала;
- ограниченные области использования метода (только в качестве биомаркера сепсиса) [61].

1.6. Метод активированных частиц (МАЧ) Endotox

Метод активированных частиц (МАЧ) Endotox – это высокоспецифичный способ определения ЛПС в крови с целью дальнейшей диагностики грамотрицательных бактериальных инфекций.

Чувствительность метода – 0,04 ЕЭ/мл для эндотоксинов кишечной палочки.

Для проведения теста используются диагностические наборы, в которые входят диагностикумы для выявления ЛПС разных видов бактерий. Для проведения реакции используются моноклональные антитела IqG3 и IqG2a, иммобилизованные на полистироловой подложке [54,65]. Результатом реакции является образование комплекса АГ-АТ, в ходе которого визуализируется появление крупных хлопьев и зерен, а также помутнение раствора.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Объекты исследования

В качестве объектов исследования были выбраны клинические штаммы бактерии *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* и *Staphylococcus aureus* (контрольный штамм) (коллекция Клиники БГМУ).

2.2. Приготовление селективных и дифференциально-диагностических питательных сред

Бульон Лурия-Бертани (по Миллеру) (Luria Bertani Broth, Miller, «HiMedia», Индия).

1. Применение:

питательная среда предназначена для культивирования и хранения рекомбинантных штаммов *Escherichia coli*, а также для обычного культивирования не очень прихотливых микроорганизмов.

2. Состав среды:

Ингредиенты	Вес, грамм/литр
Гидролизат казеина	15,00
Дрожжевой экстракт	5,00
Натрия хлорид	4,00
Конечное значение pH (при 25°C) 7,5 ± 0,2	

3. Ход приготовления питательной среды:

Размешивали 25,0 г порошка питательной среды в 1000 мл дистиллированной воды. Подогревали для полного растворения частиц. Стерилизовали автоклавированием при 1,1 атм (121°C) в течение 15 мин. Разливали в соответствующие емкости.

4. Культивирование в течение 18-24 ч при 35-37°C.
5. Принцип и оценка результата:
 Бульон Луриа-Бертани имеет достаточное количество питательных веществ для роста рекомбинантных штаммов. Такие штаммы обычно являются производными *Escherichia coli* K12, дефицитного по синтезу витамина группы В. Из-за этого и других маркеров ауксотрофности, полученных в ходе мутагенеза, рекомбинантные штаммы могут утрачивать способность к росту на средах обедненного состава. Гидролизат казеина обеспечивает присутствие в среде пептидов, дрожжевой экстракт – витаминов группы В, хлорид натрия – ионов натрия для мембранного транспорта и поддержания оптимального осмотического давления.
6. Посевы инкубировали в течение 48 часов при температуре 38°C в чашках Петри с твердой питательной средой Луриа-Бертани (LB-среда).

2.3. Приготовление разведений культур микроорганизмов

Приготовление разведений жидкой культуры микроорганизмов *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* и *Staphylococcus aureus* осуществляли по указанной ниже схеме:

Таблица 1 – Схема приготовления разведений микроорганизмов.

Калибратор	Разведение							
	0	10	50	10 ⁻²	5*10 ⁻²	10 ⁻³	5*10 ⁻³	10 ⁻⁴
<i>Escherichia coli</i>	0	10	50	10 ⁻²	5*10 ⁻²	10 ⁻³	5*10 ⁻³	10 ⁻⁴
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0	10	50	10 ⁻²	5*10 ⁻²	10 ⁻³	5*10 ⁻³	10 ⁻⁴
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0	10	50	10 ⁻²	5*10 ⁻²	10 ⁻³	5*10 ⁻³	10 ⁻⁴
ОКО - апиrogenная вода	-	-	-	-	-	-	-	-

Калибратор	Разведение							
	0	10	50	10^{-2}	$5 \cdot 10^{-2}$	10^{-3}	$5 \cdot 10^{-3}$	10^{-4}
<i>Staphylococcus aureus</i>	0	10	50	10^{-2}	$5 \cdot 10^{-2}$	10^{-3}	$5 \cdot 10^{-3}$	10^{-4}

Таблица 2 – Схема заполнения планшета для ЛАЛ-теста.

	t	t	t	Хим	Хим	Хим	УЗ	УЗ	УЗ		УЗ
A	0	0	0	0	0	0	0	0	0		0
B	10	10	10	10	10	10	10	10	10		10
C	50	50	50	50	50	50	50	50	50		50
D	10^{-2}	10^{-2}	10^{-2}	10^{-2}	10^{-2}	10^{-2}	10^{-2}	10^{-2}	10^{-2}		10^{-2}
E	$5 \cdot 10^{-2}$		$5 \cdot 10^{-2}$								
F	10^{-3}	10^{-3}	10^{-3}	10^{-3}	10^{-3}	10^{-3}	10^{-3}	10^{-3}	10^{-3}		10^{-3}
G	$5 \cdot 10^{-3}$		$5 \cdot 10^{-3}$								
H	10^{-4}	10^{-4}	10^{-4}	10^{-4}	10^{-4}	10^{-4}	10^{-4}	10^{-4}	10^{-4}		10^{-4}

2.4. Экстракция липополисахаридов из клеточных стенок бактериальных клеток

Целью данной работы являлась разработка эффективного и высокопроизводительного метода получения препарата ЛПС из клеточной стенки грамотрицательных бактерий, максимально очищенного от различных примесей (в том числе нуклеиновых кислот). Именно поэтому нами был проведен эксперимент по апробированию сразу нескольких методов экстракции, суть которых изложена ниже. Выбранные способы являются не дорогими, быстрыми и безопасными.

Первый метод экстракции ЛПС заключался в нагревании бактериальных суспензий и состоял из следующих этапов:

- автоклавирование жидкой культуры бактерий, приготовленной в соответствии с разведением по стандарту мутности, при 121°C в течении 30 мин.;

- перемешивание остывшей культуры и центрифугирование пробирок в течение 10 минут при 9000 об/мин.;
- перенос надосадочной жидкости в чистые пробирки.

Второй метод экстракции ЛПС заключался в химическом разрушении бактериальных клеток и включал следующие этапы:

- приготовление разведения культуры бактерий в 500 мкл деионизированной воды;
- двойная отмывка бактериальных клеток в деионизированной воде;
- ресуспендирование клеток в 65 мкл смеси 30% ацетонитрила и 0,1% раствора трихлоруксусной кислоты;
- приготовление смеси 7 мкл образца и 7 мкл раствора лизоцима (0,5 мг/мл);
- инкубирование полученной смеси при 37°C в течение 30 минут.

Ключевым этапом осуществления третьей методики экстракции ЛПС было использование ультразвука. Этапы выделения:

- приготовление разведения культуры микроорганизма в 30 мл 0,01М фосфатного буфера (в соответствии с определенным стандартом мутности);
- помещение емкости на ледяную баню и проведение дезинтеграции бактериальных клеток при 100% мощности прибора в течение 5 минут;
- перенос клеток в пробирки для центрифугирования сразу после окончания процесса дезинтеграции и

центрифугирование в течение 10 минут при 9000 об/мин.;

— перенос надосадочной жидкости в чистые пробирки.

2.5. Проведение ЛАЛ-теста

Для постановки ЛАЛ-тест использовали диагностические наборы для определения эндотоксинов в ходе хромогенного теста (производитель - Nycult biotech).

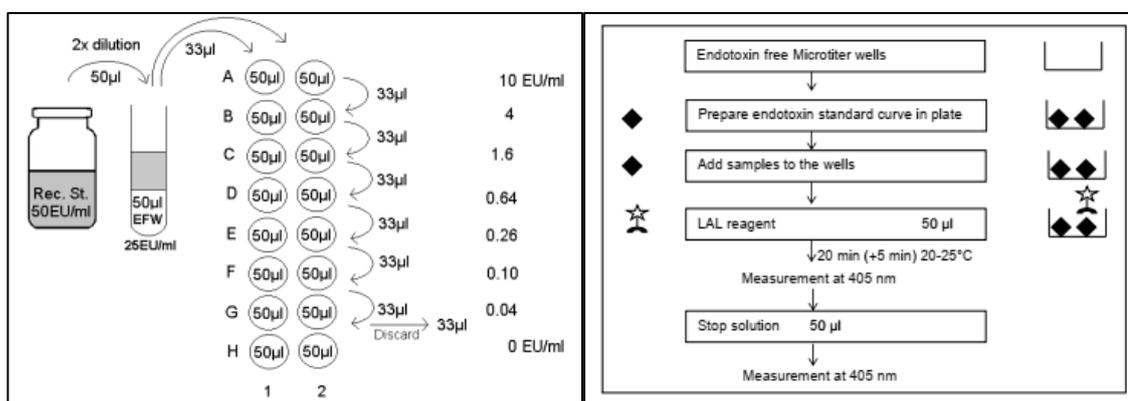


Рисунок 2 – Краткая схема постановки ЛАЛ-теста.

Перед использованием довели все реагенты до комнатной температуры (20–25°C). Ход работы:

- 1) определяли количество испытательных лунок, необходимых для анализа стандартов, контролей и образцов;
- 2) доставали планшет для микротитрования из пакета для хранения и нумеровали планшет лабораторным номером;
- 3) для стандартных серий разбавляли восстановленный стандарт в 2 раза, 50 мкл стандарта с 50 мкл;
- 4) для дублирования стандартной кривой заполняли 16 лунок планшета 50 мкл EFW, перенесли 33 мкл;
- 5) разбавленный стандарт в лунку A1 и разбавляли еще 1:1,5 путем тщательного перемешивания и пипетирования;

- 6) добавляли 33 мкл в лунку В1 и снова в следующую лунку и так далее до лунки G1;
- 7) переносили по 50 мкл из каждого (разбавленного) образца и контроля в соответствующие лунки в двух повторностях;
- 8) добавляли 50 мкл/лунку восстановленного ЛАЛ-реагента;
- 9) накрывали планшет и инкубировали в течение 20 минут при комнатной температуре;
- 10) измеряли образцы при длине волны 405 нм;
- 11) останавливали реакцию, добавив 50 мкл 1х стоп-раствора, сохраняя ту же последовательность и время, затем аккуратно постукивали по лотку, чтобы смешать растворы в лунках и для устранения пузырьков воздуха, попавших в лунки;
- 12) помещали лоток в планшетный считыватель ELISA и измеряли оптическую плотность при 405 нм, следуя инструкциям производителя прибора.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

3.1. Экстракция липополисахаридов из клеточных стенок бактериальных клеток

Анализ препаратов ЛПС бактерий *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* и *Staphylococcus aureus*, полученных в ходе экстракции с помощью выбранных нами методов выделения эндотоксинов, позволил выявить некоторую закономерность - с каждым новым разведением бактериальной суспензии практически всегда происходило уменьшение концентрации выделяемых бактериальных эндотоксинов. Результаты проверки полученных препаратов ЛПС тестируемых клинических штаммов микроорганизмов представлены в таблице 3.

Результаты анализа препаратов ЛПС с помощью ЛАЛ-теста

Таблица 3 – Метод экстракции ЛПС №1 - нагревание

Разведение	Микроорганизмы			
	<i>Escherichia coli</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
0	17,71	16,22	14,46	-
10	8,35	8,09	9,39	-
10 ⁻²	7,96	7,96	7,47	-
10 ⁻³	7,08	7,08	6,37	-
10 ⁻⁴	1,95	1,95	3,44	-

Таблица 4 – Метод экстракции ЛПС №2 – химическое разрушение

Разведение	Микроорганизмы			
	<i>Escherichia coli</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>

0	11,54	18,53	11,27	-
10	8,02	6,97	6,64	-
10 ⁻²	6,31	6,97	7,14	-
10 ⁻³	5,28	7,03	4,99	-
10 ⁻⁴	2,54	2,73	2,59	-

Таблица 5 – Метод экстракции ЛПС №3 – воздействие ультразвуком

Разведение	Микроорганизмы			
	<i>Escherichia coli</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
0	12,92	7,25	6,75	6,09
10	7,52	7,8	6,81	1,95
10 ⁻²	6,26	6,92	6,48	0
10 ⁻³	6,15	6,15	7,8	0
10 ⁻⁴	3,09	3,53	3,92	0

На основании полученных экспериментальных данных для дальнейшего использования были выбраны концентрации 0, 10⁻² и 10⁻⁴. При этом разведение 0 – дает возможность измерения исходной концентрации ЛПС, 10⁻² – наиболее оптимальное разведение микробной суспензии, исследование которого позволяет получить количественные данные содержания ЛПС во всех исследуемых культурах бактерий, 10⁻⁴ – максимальное разведение микробной жидкой культуры, в которой определяется концентрация ЛПС для грамотрицательных бактерий и не определяется для грамположительных бактерий.

Результаты анализа ЛПС с помощью ЛАЛ-теста могут быть обусловлены различной эффективностью методов экстракции для конкретного объекта исследования. Так, метод нагревания показал наибольшее содержание ЛПС у *Escherichia coli* - 17,71 и *Klebsiella*

pneumonia – 14,46, метод химического разрушения у *Pseudomonas aeruginosa* – 18,53%. Стоит отметить, что не один из описанных ранее методов, кроме ультразвукового воздействия, не обнаружил содержание ЛПС у *Staphylococcus aureus* при отсутствии разведения.

В результате нами был выбран наиболее оптимальный способ экстракции ЛПС – метод с использованием ультразвукового излучения. Ввиду получения достаточно высоких концентраций ЛПС при разведении 10^{-4} по сравнению с другими методами и возможности создания более контролируемых условий проведения процедуры данный метод показался нам наиболее подходящим для дальнейших исследований.

3.2. Модификация условий культивирования тестируемых штаммов микроорганизмов

На следующем этапе нами была проведена работа по изменению условий культивирования тестируемых микроорганизмов *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* и *Staphylococcus aureus*. Ниже представлены обновленные условия:

- культивирование культур микроорганизмов в течение 3 суток;
- добавление в состав питательной среды 0,5% глюкозы из расчета 5 г на 1000 мл среды;
- добавление в состав питательной среды NaCl в том количестве, когда концентрация достигает значения 2,36 г на 1000 мл среды.

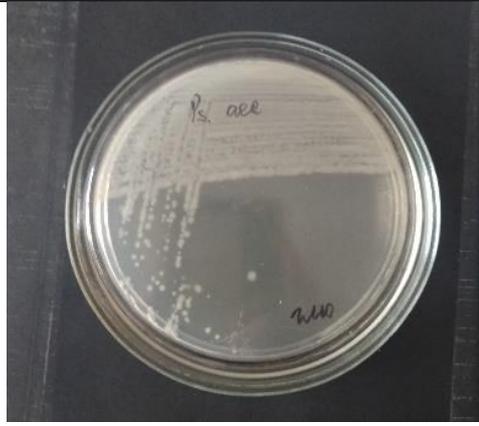
<p>Культивирование <i>Escherichia coli</i> на LB-среде при добавлении 0,5% глюкозы в состав питательной среды</p>	
<p>Культивирование <i>Klebsiella pneumoniae</i> на LB-среде при добавлении 0,5% глюкозы в состав питательной среды</p>	
<p>Культивирование <i>Pseudomonas aeruginosa</i> на LB-среде при добавлении 0,5% глюкозы в состав питательной среды</p>	

Рисунок 3 – культивирование исследуемых микроорганизмов на среде с добавлением глюкозы.

<p>Культивирование <i>Escherichia coli</i> на LB-среде при добавлении NaCl в состав питательной среды</p>	
<p>Культивирование <i>Klebsiella pneumoniae</i> на LB-среде при добавлении NaCl в состав питательной среды</p>	
<p>Культивирование <i>Pseudomonas aeruginosa</i> на LB-среде при добавлении NaCl в состав питательной среды</p>	

Рисунок 4 – культивирование исследуемых микроорганизмов на среде с добавлением NaCl

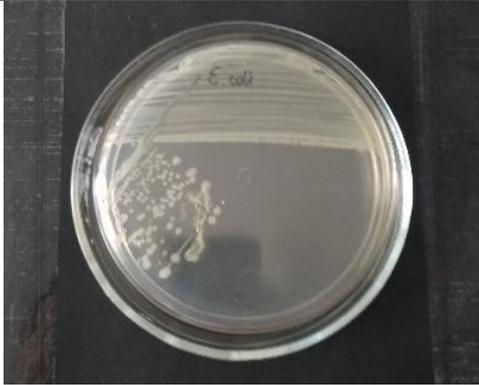
<p>Культивирование <i>Escherichia coli</i> на LB-среде на I этапе эксперимента</p>	
<p>Культивирование <i>Klebsiella pneumoniae</i> на LB-среде на I этапе эксперимента</p>	
<p>Культивирование <i>Pseudomonas aeruginosa</i> на LB-среде на I этапе эксперимента</p>	

Рисунок 5 – культивирование исследуемых микроорганизмов на I этапе эксперимента.

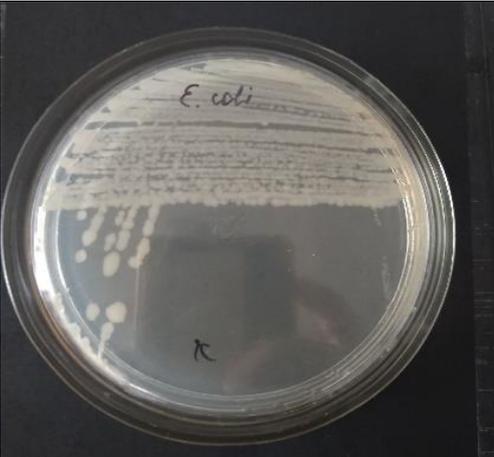
<p>Культивирование <i>Escherichia coli</i> на LB-среде на II этапе эксперимента (контроль)</p>	
<p>Культивирование <i>Klebsiella pneumoniae</i> на LB-среде на II этапе эксперимента (контроль)</p>	
<p>Культивирование <i>Pseudomonas aeruginosa</i> на LB-среде на II этапе эксперимента (контроль)</p>	

Рисунок 6 – культивирование исследуемых микроорганизмов на II этапе эксперимента

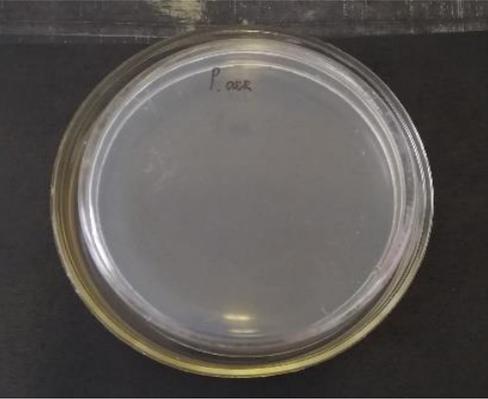
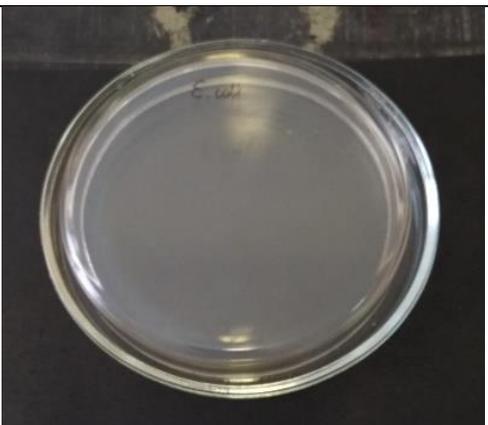
<p>Культивирование <i>Escherichia coli</i> на LB-среде – отсутствие роста</p>	
<p>Культивирование <i>Klebsiella pneumoniae</i> на LB-среде – отсутствие роста</p>	
<p>Культивирование <i>Pseudomonas aeruginosa</i> на LB-среде – отсутствие роста</p>	

Рисунок 7 – Питательные среды до начала инкубации.

При культивировании *Pseudomonas aeruginosa* на LB-среде с добавлением NaCl наблюдался скудный рост бактерий, в то время, как при добавлении в состав питательной среды 0,5% глюкозы наблюдался более обильный рост. Для *Escherichia coli* и *Klebsiella pneumoniae* достоверных различий в росте на разных питательных средах не зафиксировано.

3.3. Сравнительный анализ содержания ЛПС у разных видов бактерий с помощью ЛАЛ-теста

По окончании культивирования проводили дезинтеграцию бактериальных клеток с помощью ультразвука и измеряли содержание ЛПС в полученных препаратах с помощью ЛАЛ-теста. Результаты анализа препаратов бактериальных ЛПС представлены в таблице 6.

Таблица 6 – Результаты анализа количественного содержания ЛПС в биопробах с помощью ЛАЛ-теста

Микроорганизм	Разведение	Контроль	Изменение условий		
			3 суток	Глюкоза	NaCl
<i>Escherichia coli</i>	0	9,07	9,97	9,64	11,07
	10 ⁻²	7,29	7,21	7,36	6,71
	10 ⁻⁴	4,57	6,36*	7,21*	5,14
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0	9,36	9,11	8,50	8,57
	10 ⁻²	7,00	7,36	6,29	4,43
	10 ⁻⁴	4,71	6,00*	5,79	2,83*
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0	7,07	10,43	8,50	8,93
	10 ⁻²	6,07	6,79	8,07	7,86
	10 ⁻⁴	3,94	3,27	7,64*	4,36
<i>Staphylococcus aureus</i> (контрольный штамм)	0	10,07	-	-	-
	10 ⁻²	0	-	-	-
	10 ⁻⁴	0	-	-	-

Примечание: * – различие со значениями в группе сравнения достоверно (p < 0,001)

Статистический анализ данных, полученных при определении концентраций ЛПС у бактерий, культивируемых в измененных условиях,

показал, что подобные модификации в большинстве случаев статистически значимо увеличивают выход целевого продукта, о чем говорят значения, полученные при разведении 10^{-4} (табл. 6).

Например, для вида *Escherichia coli* по сравнению с контрольной группой было характерно выделение большего количества ЛПС даже при разведении 10^{-3} . Культивировании культуры микроорганизма в течение 3 суток, а также добавление в состав питательной среды 0,5% глюкозы статистически значимо ($p < 0,001$) увеличило выход ЛПС на 28,1% и 36,6% соответственно. Аналогичная картина была характерна для вида *Klebsiella pneumoniae*, однако, если удлинение культивирования до 3 суток приводило к достоверному увеличению концентрации бактериального эндотоксина, то сравнивая количественные сдвиги содержания экстрагируемой ЛПС в образце в ходе изменения состава питательной среды, предпочтение можно отдать условиям с добавлением 0,5% глюкозы, поскольку при добавлении NaCl происходит статистически значимое уменьшение выхода ЛПС на 39,9%. Для бактерии *Pseudomonas aeruginosa* достоверное увеличение выхода ЛПС наблюдалось лишь при изменении состава питательной среды, в частности добавления 0,5% глюкозы. В таком случае наблюдалось достоверное эффективное увеличение экстрагируемой бактериальной ЛПС на 48,2%.

Таким образом, нам удалось наглядно продемонстрировать эффективность выбранного нами метода экстракции ЛПС из клеточной стенки тестируемых бактерий и доказать, что метод ультразвукового воздействия характеризуется наиболее высокой производительностью и возможностью получения максимально чистого препарата ЛПС.

ВЫВОДЫ

1. Липополисахариды грамотрицательных бактерий являются биологически активными молекулами широкого спектра действия, обладающими протективной, противоопухолевой и иммуномодулирующей активностью.

2. На основании проведенного эксперимента можно заключить, что исследованные штаммы *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* могут быть рассмотрены как потенциальные суперпродуценты ЛПС.

3. Наиболее эффективным методом экстракции ЛПС грамотрицательных бактерий представляется метод ультразвукового воздействия, который характеризуется более высокой производительностью и возможностью освобождения препаратов ЛПС от большей части контаминирующих высокомолекулярных органических соединений, в том числе от нуклеиновых кислот.

4. Методом количественного определения содержания ЛПС в культурах бактерий с помощью ЛАЛ-теста было установлено содержание ЛПС у разных видов бактерий при культивировании в стандартных условиях: *Escherichia coli* - 4,57, *Klebsiella pneumoniae* - 4,71, *Pseudomonas aeruginosa* - 3,94.

5. На продукцию ЛПС можно влиять, изменяя условия культивирования микроорганизмов: добавлением в среду глюкозы, NaCl, а также продлевая время инкубации до 3 дней.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Anisimova N.Yu. Immunological pathogenesis of sepsis and use of hemosorption for treatment of cancer patients with sepsis. N.Y.: Nova Science Publishers Inc.; 2014: 57–114.
2. Araujo F.G., Slifer T.L., Remington J.S. Effect of moxifloxacin on secretion of cytokines by human monocytes stimulated with lipopolysaccharide. *Clin Microbiol Infect* 2002; 8(1):26–30.
3. Balistreri C.R. LPS-mediated production of pro/anti-inflammatory cytokines and eicosanoids in whole blood samples: biological effects of +896A/G TLR4 polymorphism in a Sicilian population of healthy subjects / C. R. Balistreri [et al.] // *Mech. Ageing Dev.* – 2011. – 132, N3. – P. 86–92.
4. Bohm M., Richter J., Kelsen S. Esophageal dilation: simple and effective treatment for adults with eosinophilic esophagitis and esophageal rings and narrowing // *Dis. Esophagus.* – 2010. – Vol. 23. – P. 377–385.
5. Boroni Moreira A.P. The influence of endotoxemia on the molecular mechanisms of insulin resistance / A. P. Boroni Moreira, R. de Cássia Gonçalves Alfenas // *Nutr. Hosp.* – 2012. – 27, N2. – P. 382–390.
6. Bosshart H., Heinzelmann M. Targeting bacterial endotoxin: two sides of a coin. *Ann. NY Acad. Sci.*, 2007, v.1096, p.1-17.
7. Boutagy N.E. Metabolic endotoxemia with obesity: Is it real and is it relevant? / N. E. Boutagy [et al.] // *Biochimie.* – 2016. – 124. – P. 11–20.
8. Brandenburg K. Conformation and supramolecular structure of lipid A / K. Brandenburg, U. Seydel // *Adv. Exp. Med. Biol.* – 2009. – 667. – P. 25–38.
9. Brandenburg K. Endotoxins: relationship between structure, function, and activity / K. Brandenburg, A. B. Schromm, T. Gutschmann // *Subcell Biochem.* – 2010. – 53. – P. 53–67.

10. Brandenburg K. Endotoxins: relationships between structure, function, and activity / K. Brandenburg, A. Wiese // *Curr. Top. Med. Chem.* – 2004. – 4, N11. – P. 1127–1146.
11. Brandtzaeg P. Function of mucosa-associated lymphoid tissue in antibody formation / P. Brandtzaeg // *Immunol. Invest.* – 2010. – 39, N4–5. – P. 303–355.
12. Bukharin O.V. Ligands for selective removal of bacterial endotoxins from gram-negative bacteria. *Zhurnal Mikrobiologii, Epidemiologii i Immunobiologii.* 2017; 3: 115-126.
13. Buttenschoen K. Endotoxin elimination in sepsis: physiology and therapeutic application / K. Buttenschoen, P. Radermacher, H. Bracht // *Langenbecks Arch. Surg.* – 2010. – 395, N6. – P. 597–605.
14. Caroff M., Karibian D. Structure of bacterial lipopolysaccharides. *Carbohydr. Res.* 2003; 338 (23): 2431–2447.
15. Caroff M., Karibian D. Structure of bacterial lipopolysaccharides. *Carbohydr. Res.* 2003; 338 (23): 2431–2447.
16. Chapman S. Gram-negative sepsis in the intensive care unit: avoiding therapeutic failure / S. Chapman, J. R. Iredell // *Curr. Opin. Infect. Dis.* – 2008. – 21, N6. – P. 604–609.
17. Charalambous B.M. Role of bacterial endotoxin in chronic heart failure: the gut of the matter / B. M. Charalambous [et al.] // *Shock.* – 2007. – 28, N1. – P. 15–23.
18. Cross A. S. Anti-endotoxin vaccines: back to the future / A. S. Cross // *Virulence.* – 2014. – 5, N1. – P. 219–225.
19. Das A. P. Recent advances in biosensor based endotoxin detection / A. P. Das, P. S. S. Kumar Swain // *Biosens. Bioelectron.* – 2014. – 51. – P. 62–75.
20. Ebbensgaard A, Mordhorst H, Aarestrup FM, Hansen EB. The Role of Outer Membrane Proteins and Lipopolysaccharides for the Sensitivity of

- Escherichia coli to Antimicrobial Peptides. *Front. Microbiol. Res.* 2018; 9:2153. DOI: 10.3389/fmicb.2018.02153
21. Foster D.M., Derzko A.N., Keffer J.H. Can sepsis be better defined? Contribution of a novel assay for endotoxin. *Clin. Microbiol. Newslet.* 2004; 26 (3): 17-21.
 22. Foster D.M., Derzko A.N., Keffer J.H. Can sepsis be better defined? Contribution of a novel assay for endotoxin. *Clin. Microbiol. Newslet.* 2004; 26 (3): 17-21. DOI: 10.1016/S0196-4399(04)90010-4
 23. Galanos C., Jiao B.H., Komuro T., Freudenberg M.A., Luderitz O. Large-scale fractionation of S-form lipopolysaccharide from *Salmonella abortus equi*. Chemical and serological characterization of the fractions. *J Chromatogr.* 1988 May 25; 440: 397-404.
 24. Giske C. G. [et al.] // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 2008. – 52, N3. – P. 813–821. Clinical and economic impact of common multidrug-resistant gram-negative bacilli / C. G. Giske [et al.] // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 2008. – 52, N3. – P. 813–821.
 25. Grallert H., Leopoldseder S., Schuett M., Kurze P., Buchberger B. EndoLISA®: a novel and reliable method for endotoxin detection. *Nature methods. Application notes.* 2011; 3-5.
 26. Ishihata K., Kakihana Ya., Yasuda T., Imabayashi T., Nakamura N. Newly developed endotoxin measurement method (the Endotoxin Activity Assay) may reflect the severity of sepsis. *Open J. Pathol.* 2013; 3: 1-6.
 27. Jang H-W, An J-H, Kim KB, Lee J-H, Oh Y-I, Park S-M, et al. Canine peripheral blood mononuclear cell-derived B lymphocytes pretreated with lipopolysaccharide enhance the immunomodulatory effect through macrophage polarization. 2021 *Res.PLoS ONE* 16(11): e0256651. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0256651>

28. Kabanov D. S. Structural analysis of lipopolysaccharides from gram-negative bacteria / D.S. Kabanov, I.R. Prokhorenko // *Biochemistry*. – 2010. – 75, N4. – P. 383–404.
29. Kagan J. C. Lipopolysaccharide Detection across the Kingdoms of Life / J. C. Kagan // *Trends Immunol.* – 2017. – 24. – P. 32-40.
30. Kiers D., Koch R.M., Hamers L., Gerretsen J., Thijs E.J.M., van Ede L. et al. Characterization of a model of systemic inflammation in humans in vivo elicited by continuous infusion of endotoxin / D. Kiers, R.M. Koch, L. Hamers, J. Gerretsen, E.J.M. Thijs, L. van Ede // *Scientific Reports*. – 2017. - 7: 40149.
31. Lauretti-Ferreira F, Silva PLD, Alcantara NM, Silva BF, Grabher I, Souza GO, et al. New strategies for *Leptospira* vaccine development based on LPS removal. 2020 Res. PLoS ONE 15(3): e0230460. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0230460>
32. Li Y. Impact of nosocomial infections surveillance on nosocomial infection rates: A systematic review / Y. Li [et al.] // *Int. J. Surg.* – 2017. – 42. – P. 164–169.
33. Magalhães P.O., Lopes A.M., Mazzola P.G., Rangel-Yagui C., Penna T.C., Pessoa A.Jr. Methods of endotoxin removal from biological preparations: a review. *J. Pharm. Pharm. Sci.* 2007; 10 (3): 388–404. PMID: 17727802
34. Marshall J.C., Walker P.M., Foster D.M., Harris D.M., Ribeiro M., Paice J., Romaschin A.D., Derzko A.N. Measurement of endotoxin activity in critically ill patients using whole blood neutrophil dependent chemiluminescence. *Crit. Care.* 2002; 6 (4): 342-348.
35. Matsumoto N., Takahashi G., Kojika M., Suzuki Ya., Inoue Yo., Inada K., Endo Sh. Interleukin-8 induces an elevation in the endotoxin activity assay (EAA) level: does the EAA truly measure the endotoxin level? *J. Infect. Chemother.* 2013; 19 (5): 825–832.

36. Morozov A.S., Bessonov I.V., Nuzhdina A.V., Pisarev V.M. Sorbents for extracorporeal removal of toxic substances and molecules with adverse biological activity (review). *Obshchaya Reanimatologiya = General Reanimatology*. 2016; 12 (6): 82–107.
37. Niederbichler A.D. Burn-induced heart failure: lipopolysaccharide binding protein improves burn and endotoxin-induced cardiac contractility deficits / A. D. Niederbichler [et al.] // *J. Surg. Res.* – 2011. – 165, N1. – P. 128–135.
38. Opal S. M. Endotoxin as a drug target / S. M. Opal, T. Gluck // *Crit. Care Med.* – 2003. – 31, N1 (Suppl). – S57–S64.
39. Opal S. M. Endotoxins and other sepsis triggers / S. M. Opal // *Contrib. Nephrol.* – 2010. – 167. – P. 14–24.
40. Opal S. M. The host response to endotoxin, antilipopolysaccharide strategies, and the management of severe sepsis / S. M. Opal // *Int. J. Med. Microbiol.* – 2007. – 297, N5. – P. 365–377.
41. Park C.Y., Jung S.H., Bak J.P., Lee S.S., Rhee D.K. Comparison of the rabbit pyrogen test and Limulus amoebocyte lysate (LAL) assay for endotoxin in hepatitis B vaccines and the effect of aluminum hydroxide. *Biologicals*. 2005; 33 (3): 145-151.
42. Rachoin J. S. Targeting endotoxin in the treatment of sepsis / J. S. Rachoin, C. A. Schorr, R. P. Dellinger // *Subcell Biochem.* – 2010. – 53. – P. 323–338.
43. Rajili-Stojanovi M. Function of the microbiota / M. Rajili-Stojanovi // *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*. – 2013. – 27. – P. 5–16.
44. Romaschin A.D., Klein D.J., Marshall J.C. Bench-to-bedside review: clinical experience with the endotoxin activity assay. *Crit. Care*. 2012; 16(6): 248-257.
45. Romaschin A.D., Klein D.J., Marshall J.C. Bench-to-bedside review: clinical experience with the endotoxin activity assay. *Crit. Care*. 2012; 16(6): 248-257.

46. Sakata M. Limulus amebocyte lysate assay for endotoxins by an adsorption method with polycation-immobilized cellulose beads / M. Sakata [et al.] // *Anal. Sci.* – 2010. – 26, N3. – P. 291–296.

47. Sato M., Matsuyama R., Kadokura T., Mori R., Kumamoto T., Nojiri K., Taniguchi K., Takeda K., Kubota K., Tanaka K., Endo I. Severity and prognostic assessment of the endotoxin activity assay in biliary tract infection. *J. Hepatobiliary Pancreat. Sci.* 2014; 21 (2): 120–127.

48. Satoh M. Clearance of bacterial lipopolysaccharides and lipid A by the liver and the role of argininosuccinate synthase / M. Satoh [et al.] // *Innate Immun.* – 2008. – 14, N1. – P. 51–60.

49. Wilkinson S.G. Bacterial lipopolysaccharides—themes and variations. *Prog. Lipid. Res.* 1996; 35 (3): 283–343.

50. Yaguchi A., Yuzawa J., Klein D.J., Takeda M., Harada T. Combining intermediate levels of the Endotoxin Activity Assay (EAA) with other biomarkers in the assessment of patients with sepsis: results of an observational study. *Crit. Care.* 2012; 16 (3): R88.

51. Yaroustovsky M., Plyushch M., Popov D., Samsonova N., Abramyan M., Popok Z., Krotenko N. Prognostic value of endotoxin activity assay in patients with severe sepsis after cardiac surgery. *J. Inflamm.* 2013; 10 (1): 8.

52. Аниховская И. А. Кишечный эндотоксин как универсальный фактор адаптации и патогенеза общего адаптационного синдрома / И. А. Аниховская [и др.] // *Физиология человека.* – 2006. – №2. – С. 87–91.

53. Апарин П.Г., Львов В.Л. Елкина С.И., Головина М.Э., Шмиголь В.И. Способ выделения биологически активной фракции (БАФ), содержащей s-липополисахариды (S-ЛПС) из грамотрицательных бактерий // Патент RU 2260053, опубл. 10.09.2005 г.

54. Бондаренко В.М. Антиэндотоксиновый иммунитет в регуляции численности эшерихиозной микрофлоры кишечника / В. М. Бондаренко, В. Г. Лиходед. – М.: Медицина, 2007 – 216 с.

55. Бондаренко В.М. Определение эндотоксина грамотрицательных бактерий в крови человека / В. М. Бондаренко, В. Г. Лиходед, М. Ю. Яковлев // Журн. микробиол. – 2002. – №2. – С. 83–89.
56. Бурыгин Г.Л., Матора Л.Ю., Щеголев С.Ю. Способ получения липополисахаридов // Патент RU 2237719, опубл. 10.10.2004 г.
57. Варбанец Л.Д. Методы исследования эндотоксинов / Л. Д. Варбанец, Г.М. Здоровенко, Ю.А. Книрель. – Киев: Наук. думка, 2006. – 233 с.
58. Варбанец Л.Д. Структура, функция, биологическая активность эндотоксинов грамотрицательных бактерий / Л. Д. Варбанец, Н. В. Винарская // Совр. проблемы токсикологии. – 2002. – №1. – С. 33–45.
59. Вестфаль О. Бактериальные липополисахариды / Методы химии углеводов / О. Вестфаль, К. Янн. – М.: Мир, 1967. – С. 325–332.
60. Вышегуров Я.Х. Кишечный эндотоксин в патогенезе воспалительной патологии глаз и антиэндотоксиновая составляющая ее лечения / Я.Х. Вышегуров [и др.] // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. – 2007. – №1. – С. 12–14.
61. Вышегуров Я.Х. Кишечный эндотоксин как облигатный фактор патогенеза эндогенных иридоциклов и эндофтальмитов неясной этиологии / Я.Х. Вышегуров [и др.]. – М.: СД–Пресс, 2006. – 133 с.
62. Иванов Д.В. Этиология внутрибольничных хирургических инфекций, вызванных грамотрицательными бактериями, и профиль их антибиотикорезистентности / Д.В. Иванов, И.В. Крапивина // Журн. микробиол. – 2007. – №5. – С. 90–93.
63. Кабанов Д.С. Связь между физико-химическими характеристиками и биологической активностью липополисахаридов / Д.С. Кабанов, И.Р. Прохоренко // Биол. мембраны. – 2011. – 28, №5. – С. 323–338.

64. Кабанов Д.С. Структурный анализ липополисахаридов грамотрицательных бактерий / Д.С. Кабанов, И.Р. Прохоренко // Биохимия (Российская академия наук). – 2010. – 75, №4. – С. 469–491.

65. Конев Ю.В. Эндотоксин (ЛПС) в патогенезе атеросклероза / Ю.В. Конев, Л.В. Лазебник // Эксп. и клин. гастроэнтерол. – 2011. – №11. – С. 15–26.

66. Копицына М.Н., Морозов А.С., Бессонов И.В., Писарев В.М., Лобакова Е.С., Бухарин О.В. Лиганды для селективного удаления бактериальных эндотоксинов грамотрицательных бактерий. Журн. микробиол. 2017; 3: 115-126.

67. Кочинкова Д. Структурное разнообразие коровой олигосахаридной области липополисахарида / Д. Кочинкова, Д.С. Лэм // Биохимия (Российская академия наук). – 2011. – 76, №7. – С. 925–931.

68. Мавзютов А.Р., Князева О.А., Гарафутдинов Р.Р., Габдрахманова А.Р. Влияние липополисахарида *Escherichia coli* на фагоцитарную и метаболическую активность нейтрофилов крови мышей с индуцированным иммунодефицитом / А.Р. Мавзютов, О.А. Князева, Р.Р. Гарафутдинов, А.Р. Габдрахманов // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2017. - № 3. - С. 84-90.

69. Мавзютов А.Р., Гарафутдинов Р.Р., Габдрахманова А.Р., Салахов И.М., Тупиев И.Д. Липополисахарид *Sinorhizobium meliloti* стимулирует гемопоэз при вторичном иммунодефиците в эксперименте / А.Р. Мавзютов, Р.Р. Гарафутдинов, А.Р. Габдрахманов, И.М. Салахаов, И.Д. Тупиев // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. – 2019. – 63, № 3. - 20-28.

70. Марков Е.Ю., Николаев В.Б. Способ получения бактериальных липополисахаридов // Патент RU 2051969, опубл. 10.01.1996 г.

71. Мешков М.В. Кишечный эндотоксин в регуляции активности системы гемостаза и патогенезе ДВС-синдрома / М. В. Мешков [и др.] // Физиол. человека. – 2005. – №6. – С. 131–136.

72. Морозов А.С., Бессонов И.В., Нуждина А.В., Писарев В.М. Сорбенты для экстракорпорального удаления токсических веществ и молекул с нежелательной биологической активностью (обзор). Общая реаниматология. 2016; 12 (6): 82–107.

73. Огороков П.Л. Кишечный эндотоксин в индукции сахарного диабета первого типа / П. Л. Огороков [и др.] // Физиология человека. – 2011. – 37, № 2. – С. 138–141.

74. Плосконос М.В., Николаев А.А. Способ выделения липополисахарида *Chlamydia trachomatis* // Патент RU 2593946, опубл. 10.08.2016 г.

75. Полунина Т.А., Гусева Н.П., Кузьмиченко И.А., Девдариани З.Л., Заднова С.П., Степанов А.В., Киреев М.Н. Способ получения липополисахарида возбудителя чумы // Патент RU 2483112, опубл. 27.05.2013 г.

76. Титов, В.Н. Липополисахариды грамотрицательных бактерий как экзогенные патогены. Транслокация бактерий *in vivo*, воспаление и патология сердечно–сосудистой системы / В.Н. Титов, С.Ф. Дугин, К.Л. Коткин // Клини. лаб. диагностика. – 2005. – № 8. – С. 23–38.



ФГБОУ ВО «Северо-Западный государственный
медицинский университет им. И.И. Мечникова»
Минздрава России

ВСЕРОССИЙСКИЙ КОНГРЕСС
ПО МЕДИЦИНСКОЙ МИКРОБИОЛОГИИ,
КЛИНИЧЕСКОЙ МИКОЛОГИИ И ИММУНОЛОГИИ

РОССИЙСКО-КИТАЙСКИЙ КОНГРЕСС
ПО МЕДИЦИНСКОЙ МИКРОБИОЛОГИИ, ЭПИДЕМИОЛОГИИ,
КЛИНИЧЕСКОЙ МИКОЛОГИИ И ИММУНОЛОГИИ»
(XXII Кашкинские чтения)

ДИПЛОМ ПОБЕДИТЕЛЯ

конкурса научных работ молодых ученых и студентов
I степени



ректор СЗГМУ им. И.И. Мечникова

НАГРАЖДАЕТСЯ Глазутдинова Л.Р., Габдрахманова А.Р., Санычюков Д.В.,

Габбасов А.З., Хабирова А.Д. ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ ФРАКЦИЙ ЛИПОПОЛИСАХАРИДА
SINORHIZOVIVUM MELILOPI НА ПОКАЗАТЕЛИ СИСТЕМЫ КРОВЕТВОРЕНИЯ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

12 - 15 июня 2019г.
г. Санкт-Петербург

Оргкомитет:
e-mail: mucosofeience@szgmu.ru, тел./факс: +7 (812) 303-51-40
194291, Россия, Санкт-Петербург, ул. Сантьяго-де-Куба, 1/28

УДК 595.2

Г.Р.Ахметова, Д.В. Саньчиков, В.К. Овчинникова

**БИОТОПИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАЗМЕЩЕНИЯ НАПОЧВЕННЫХ
БЕСПОЗВОНОЧНЫХ**

Научный руководитель - ст. преподаватель Волкова А.Т.

Кафедра биологии, Башкирский государственный медицинский университет,
г. Уфа

Резюме. Исследовано видовое разнообразие напочвенных беспозвоночных в различных биотопах в окрестностях села Дмитриевка Уфимского района Республики Башкортостан. Сбор материала проводился в июне 2015 года и июне 2016 года. Выполнены расчеты относительной численности и индекса доминирования видов. Определено 37 видов беспозвоночных.

Ключевые слова: напочвенные беспозвоночные животные, относительная численность, индекс доминирования.

G.R.Akmetova, D.V. Sanchokov, V.K.Ovchinnikova

**THE BIOTOPICAL CHARACTERISTIC OF INVERTABRATES TERRISTRAL
ACCOMONADATION**

Scientific Advisors – A.T. Volkova

Department of Biology, Bashkir State Medical University, Ufa

Summary. The diversity of ground invertebrates in different biotopes Dmitrievka village of Ufa region of Republic Bashkortostan was researched. Collecting of the material was done in a time of summer practice in June 2015 and June 2016. Calculations of relative abundance and dominance index were made. 37 species were identified.

Keywords: ground invertebrates, relative abundance and dominance index

Актуальность. Роль напочвенных беспозвоночных в любом биогеоценозе очень велика: эти сравнительно небольшие существа участвуют в круговороте веществ, являются редуцентами и пищей для многих животных и птиц. Под названием «напочвенные беспозвоночные» понимаются активно передвигающиеся формы, обитающие в верхнем слое рыхлой лесной подстилки, на поверхности почвы, в щелях и трещинах ее верхнего слоя, под различными укрытиями.[1, 2] Это пауки, имаго и частично личинки многих жуков — жужелиц, стафилинид, мертвоедов и т. д. Почти все методы учета таких форм относительные, пригодны лишь для сравнительного изучения их динамической плотности, а не реального определения плотности популяции. Наиболее близка к абсолютному учету разборка

субстрата (подстилки, мха) вручную или с помощью различных типов почвенных сит. Однако, экстраполяция таких данных на площадь не всегда возможна, поскольку эти быстро передвигающиеся формы склонны концентрироваться в определенных более благоприятных (в смысле кормности, микроклимата и других факторов, часто неизвестных исследователю) местах — под различными укрытиями, в гниющих растительных остатках, в речных наносах и т. д., причем многие летающие формы могут преодолевать в периоды максимумов активности значительные расстояния, прилетая из-за пределов учетной площади. [8]

Цель исследования. Изучить видовой состав, численность и закономерности распределения наземных беспозвоночных в различных биотопах окрестностей г. Уфы

Материал и методы. Материалом для исследования послужили наземные беспозвоночные, отловленные в окрестностях г.Уфы (июль 2015 г. и июнь 2016 г.). Учетные площадки за 2016 г. были заложены в следующих биотопах: дубово-березовый, дубово-липовый, березово-липовый-лещиновый-разнотравный лес и разнотравный луг. (окрестности села Дмитриевка). Для сбора напочвенных беспозвоночных использовали ловушки Барбера-Геллера с фиксирующим раствором (4% формалин)[7]. Ловушки устанавливались в линию через 10 метров по равнобедренному треугольнику.

Определение видов беспозвоночных проводилось в камеральных условиях и монтированием в коллекцию[3, 4, 5 , 6]. Относительную численность видов вычисляли соотношением количества видов клоушко-суткам, а так же индекс доминирования видов напочвенных беспозвоночных в % вычисляли по формуле: $D=(k*100)/K$, где D-доминирование, k-сумма особей данного вида, K-сумма особей всех видов во всех пробах [6].

Результаты и обсуждения. В результате анализа фауны беспозвоночных 4 биотопов окрестности г. Уфы в 2015 г. было собрано 814 экземпляров беспозвоночных на 108 ловушко-суток, а в 2016 г. было собрано 593 экземпляра беспозвоночных на 84 ловушко-суток.

В 2016 году была заложена новая пробная площадка в разнотравном лугу в 300 метрах от нефтяной качалки. В связи с чем растительность на лугу была вытоптана Индекс доминирования напочвенных беспозвоночных в разнотравном лугу характеризуется, следующим образом: в 2016 году доминировали муравей лесной рыжий (*Formica rufa* L.) (33,6%), пауки (*Araneae*) (28,6%), клещи (*Acari* sp.) (20,2%).

Наиболее высокое видовое разнообразие было выявлено в дубово-березовом биотопе в 2015 году 9 видов, а в 2016 году было определено 14 видов. Индекс доминирования напочвенных беспозвоночных в дубово-березовом биотопе характеризуется, следующим образом: в 2015 году доминировали пауки (*Araneae*) (38,32%), муравей лесной рыжий (*Formica rufa* L.)

(26,14%), клоп-солдатик (*Purhocori sapterus* L.) (18,12%). В 2016 году произошло увеличение численности клопов-солдатиков (*Purhocori sapterus* L.) (41%), у пауков (*Araneae*) численность уменьшилась до 19,7% и возросло количество личинок жужелиц (*Larvae* sp.) до 12,6%.

Наиболее высокое видовое разнообразие было выявлено в дубово-липовом биотопе в 2015 году 17 видов, а в 2016 году 11 видов. Индекс доминирования напочвенных беспозвоночных в дубово-липовом биотопе по наблюдениям характеризуется, следующим образом: в 2015 году доминировали личинки жужелиц (*Larvae* sp.) (19,16%), стафилиниды (*Staphylinidae*) (18,83%), мокрица броненосец обыкновенная (*Armadilidium vulgare*) (15,58%). В 2016 году в данном биотопе доминировали жужелицы птеростих черный (*Pterostichus niger* Schall) (24,24%), пауки (*Araneae*) (16,16%), птеростих разноцветный (*Pterostichus versicolor* Sturm) (13,13%).

Наиболее высокое видовое разнообразие было выявлено в березово-липово-лещиново-разнотравном биотопе в 2016 году 11 видов, а в 2015 году 8 видов. Индекс доминирования составил в 2015 году у клопа-солдатика (*Purhocori sapterus* L.) (21,43%), муравей лесной рыжий (*Formica rufa* L.) (13,39%), мокрица броненосец обыкновенная (*Armadilidium vulgare*) (7,14%). В 2016 году численность клопов-солдатиков (*Purhocori sapterus* L.) возросла до 27,1%. Также в 2016 году в данном биотопе увеличилось количество птеростиха красивого (*Pterostichus lepidum*) и пауков (*Araneae*) до 21,5%.

Заключение и выводы.

1. За период исследования было определено 37 видов напочвенных беспозвоночных, относящихся к 4 классам, 9 отрядам и 17 семействам.
2. В 2015 году во всех биотопах доминировали пауки (*Araneae*) и личинки жужелиц (*Larvae* sp.), а в 2016 году доминировали во всех биотопах птеростихи (*Pterostichus*) и клопы-солдатики (*Purhocori sapterus* L.).
3. В 2015 году наибольшее количество видов встретилось в дубово-липовом (17) и дубово-березовом (9) биотопе, а в 2016 году наибольшее количество видов встретилось в дубово-березовом (14) и березово-липово-лещиново-разнотравном (11) биотопе.

Список литературы.

1. Алексанов В. В., Дифференциация комплексов напочвенных беспозвоночных на урбанизированной территории (на примере города Калуги) // «Живые и биокосные системы». – 2013. – № 5; URL: <http://www.jbks.ru/archive/issue-5/article-10>
2. Богач Я., Ружечка В. Анализ экологических групп видов сообществ напочвенных беспозвоночных как показатель качества окружающей среды // Экология. 1988. № 6. – С. 59 - 61.
3. Горностаев Г.Н. Определитель насекомых фауны России/ Г.Н. Горностаев. – М.: Гардарики, 1995.
4. Мамаев Б.М., Медведев Л.Н., Правдин Ф.Н. Определитель насекомых Европейской части СССР. М.: Просвещение, 1976.
5. Насекомые европейской части России: Атлас с обзором биологии /В.М.Карцев, Г.В.Фарафонова, А.К.Ахатов, Н.В.Беляева, А.А. Бенедиктов, М.В. Березин, О.Г. Волков, Н.А.Гура, Ю.В. Лопатина, Л.И.Лютикова, А.С.Просвири, Г.И.Рязанова, Е.Ю. Ткачева, П.В.Альбрехт. – М.: Фитон XXI, 2015. – 568 с.: ил.
6. Фасулати К.К. Полевое изучение наземных беспозвоночных: Учебное пособие для студентов ун-ов. М.: Высшая школа, 1971.
7. Barber H. S. Traps for Inhabiting // Journal of the Elisha Mitchell Scientific Society. 1931. Vol. 46. P. 259-266.
8. <http://mirznanii.com/a/6246/nasekomye>.

МОРФОМЕТРИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ЭФФЕКТОВ ФРАКЦИЙ ЛИПОПОЛИСАХАРИДА *ENSIFER MELILOTI* НА ПАРЕНХИМАТОЗНЫЕ ОРГАНЫ ЛАБОРАТОРНЫХ КРЫС С ВТОРИЧНЫМ ИММУНОДЕФИЦИТОМ

А.Р. Мавзютов¹, Л.Р. Глазутдинова¹, Д.В. Саньчиков¹, В.С. Щекин¹,
Р.Р. Гарафутдинов², А.В. Чижова¹, А.Р. Габдрахманова³

¹ Башкирский государственный медицинский университет, г. Уфа, Россия

² Институт биохимии и генетики УФИЦ РАН, г. Уфа, Россия

³ ГБУЗ МЗ РБ Городская клиническая больница № 13, г. Уфа, Россия

Резюме. *Введение.* Липополисахариды грамотрицательных бактерий (ЛПС) более известны как бактериальные эндотоксины. Однако в специальной литературе все больше данных о целом ряде физиологических эффектов ЛПС, наблюдаемых и в норме. В частности, показана иммуномодулирующая активность ЛПС некоторых видов бактерий. Цель исследования — характеристика физиологических эффектов липополисахаридов *Ensifer meliloti* при индуцированном иммунодефиците у крыс в эксперименте. *Материалы и методы.* На 60 беспородных крысах-самцах, у которых индуцировали иммунодефицитное состояние при внутрибрюшинном введении цитостатика — циклофосамида, исследована биологическая активность фракций ЛПС *E. meliloti*. Исследуемые фракции ЛПС *E. meliloti* вводили внутрибрюшинно через 24 часа после инъекции ЦФ в течение 21 дня. На 22-е сутки эксперимента лабораторные животные подвергались эвтаназии и аутопсии с последующим морфометрическим исследованием внутренних органов. В дальнейшем парафиновые срезы паренхиматозных органов окрашивались гематоксилин-эозином и исследовались гистологически посредством световой микроскопии. *Результаты.* Установлено, что при введении циклофосамида лабораторным животным по окончании периода наблюдения имело место незначительное снижение массы печени и почек; вес сердца и селезенки оставался неизменным (в сравнении с интактными животными). Однако указанные изменения были статистически не значимы. Статистически достоверно у иммунодефицитных крыс в сравнении с животными контрольной группы увеличивался лишь вес легких. При внутрибрюшинном введении фракций ЛПС на фоне вторичного иммунодефицита изменяются весовые характеристики наиболее интенсивно кровоснабжаемых органов (печень и почки), что указывает на системный характер их эффектов. В селезенке отмечено характерное увеличение количества фолликулов с крупными герминативными центрами, а также вторичных фолликулов стромы органа с образованием лимфоидных муфт; в печени — лимфоидная инфильтрация в портальных трактах и восстановление до нормы сосудистого рисунка; в легких при введении ЛПС и «Ликопада» — выраженная

Адрес для переписки:

Мавзютов Айрат Радикович
450008, Россия, г. Уфа, ул. Ленина, 96/98
ФГБОУ ВО Башкирский государственный медицинский университет МЗ РБ.
Тел.: 8 (347) 276-19-60.
E-mail: ufalab@mail.ru

Contacts:

Ayrat R. Mavzyutov
450008, Russian Federation, Ufa, Lenin str., 96/98,
Bashkir State Medical University.
Phone: +7 (347) 276-19-60.
E-mail: ufalab@mail.ru

Для цитирования:

Мавзютов А.Р., Глазутдинова Л.Р., Саньчиков Д.В., Щекин В.С.,
Гарафутдинов Р.Р., Чижова А.В., Габдрахманова А.Р. Морфометрическая характеристика эффектов фракций липополисахарида *Ensifer meliloti* на паренхиматозные органы лабораторных крыс с вторичным иммунодефицитом // Инфекция и иммунитет. 2021. Т. 11, № 1. С. 93–100. doi: 10.15789/2220-7619-MCO-1242

Citation:

Mavzyutov A.R., Glazutdinova L.R., Sanchokov D.V., Shechkin V.S.,
Garafutdinov R.R., Chizhova A.V., Gabdrakhmanova A.R. Morphometric characteristics of effects induced by *Ensifer meliloti* lipopolysaccharide fractions on parenchymatous organs in laboratory rats with secondary immunodeficiency // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2021, vol. 11, no. 1, pp. 93–100. doi: 10.15789/2220-7619-MCO-1242

гиперплазия лимфоидной ткани с крупными герминативными центрами. *Заключение.* Полученные данные свидетельствуют о том, что исследованные фракции ЛПС *E. meliloti* при вторичном иммунодефиците у крыс вызывают положительные изменения иммунореактивности.

Ключевые слова: липополисахариды, *E. meliloti*, крысы, вторичный иммунодефицит, «Липоид», гистология.

MORPHOMETRIC CHARACTERISTICS OF EFFECTS INDUCED BY *ENSIFER MELILOTI* LIPOPOLYSACCHARIDE FRACTIONS ON PARENCHYMATOUS ORGANS IN LABORATORY RATS WITH SECONDARY IMMUNODEFICIENCY

Mavzyutov A.R.^a, Glazutdinova L.R.^a, Sanchokov D.V.^a, Shechkin V.S.^a, Garafutdinov R.R.^b, Chizhova A.V.^a, Gabdrakhmanova A.R.^c

^a Bashkir State Medical University, Ufa, Russian Federation

^b Institute of Biochemistry and Genetics UFRC RAS, Ufa, Russian Federation

^c City Clinical Hospital No. 13, Ufa, Russian Federation

Abstract. Introduction. Gram-negative bacteria-derived lipopolysaccharides (LPS) are better known as bacterial endotoxins. However, an increasing body of evidence has been accumulated regarding a whole range of LPS-bound physiological effects also observed in normal settings. In particular, LPS derived from some bacterial species was shown to exhibit an immunomodulating activity. Study objective — to characterize physiological effects of *Ensifer meliloti* lipopolysaccharides in modelled rat induced immunodeficiency. **Materials and methods.** Biological activity of intraperitoneally administered *E. meliloti* LPS fractions was studied for 21 days in 60 outbred male rats after induction of a minimal immunodeficiency state 24 hours later after inoculating cytostatic agent cyclophosphamide (CF). Animals were euthanized on day 22 followed by conducting an autopsy and morphometric study of internal organs. Later, paraffin-embedded sections of parenchymal organs were stained with hematoxylin-eosin and examined histologically by light microscopy. **Results.** It was found that at the end of the experiment cyclophosphamide applied to laboratory animals insignificantly decreased weight of liver and kidney, but not that of heart and spleen (compared to intact animals). In contrast, lung weight was solely significantly increased in immunodeficient rats compared to control. Intraperitoneally administered LPS fractions during secondary immunodeficiency affected weight parameters in the liver and kidney as the most intensively blood supplied organs suggesting its systemic effects. Quantity of follicles with large germinal centers as well as secondary follicles and lymphatic sheath formation in splenic stroma was increased that features activated immune response. Moreover, hepatic lymphoid infiltration in the portal tracts and reversal to normal vascular pattern were found as well. In contrast, LPS and Licopid administered to rats resulted in marked lung hyperplasia of lymphoid tissue containing large germinal centers. **Conclusion.** The data obtained indicate that *E. meliloti*-derived LPS fractions administered to rats with secondary immunodeficiency positively affected immunoreactivity.

Key words: LPS, *E. meliloti*, rats, secondary immunodeficiency, Licopid, histology.

Введение

Одной из наиболее актуальных проблем медицины остается сепсис [1], этиологию которого в 60–70% случаев связывают с микроорганизмами [2, 3]. В качестве основного индуктора системных воспалительных реакций при этом рассматривается участие липополисахарида клеточной стенки (ЛПС) грамотрицательных бактерий, взаимодействующего с Toll-подобными рецепторами типа 4 (TLR-4), что впоследствии приводит к развитию сверхсильного иммунного ответа [4]. В частности, ЛПС рассматривается в качестве одного из основных факторов вирулентности *Yersinia pestis* и патогенных вариантов *Yersinia pseudotuberculosis* [5, 6, 7].

На молекулярном уровне участие и негативные эффекты ЛПС достаточно хорошо охарактеризованы при различных патологических состояниях, как у человека, так и у лабораторных животных [8, 9, 10, 11]. При этом установлено, что системная эндотоксинемия имеет место и в норме. Так, например, физиологическая концен-

трация ЛПС в кровотоке составляет 3–10 пкг/мл [12], и при таких небольших концентрациях ЛПС клеточной стенки грамотрицательных бактерий обладает иммуномодулирующей активностью [13, 14]. Более того, установлено, что ЛПС-опосредованная активация TLR-4 может сопровождаться положительным пролиферативным влиянием на стволовые клетки нервной системы, способствуя их дифференцировке и повышая выживаемость, например, иммунодефицитных крыс и мышей [15].

В исследовании Vincent J.L. и соавт. была продемонстрирована возможность препаративного выделения фракций ЛПС *Escherichia coli* [16]. В этой связи определенным научным интересом представляет оценка биологической активности фракций ЛПС, выделенных из непатогенных для человека грамотрицательных бактерий, относящихся к виду *Ensifer meliloti* и являющихся естественными азотфиксирующими симбионтами бобовых растений [17].

Цель исследования — характеристика физиологических эффектов ЛПС *E. meliloti* на орган-

ном и тканевом уровне в эксперименте на лабораторных крысах с индуцированным иммунодефицитом для экспериментальной оценки иммуномодулирующих перспектив липополисахаридов грамотрицательных бактерий.

Материалы и методы

Для выделения и исследования биологической активности липополисахарида использовали культуру *E. meliloti*, штамм Л-14 из коллекции микроорганизмов «Симбионт» (Институт биохимии и генетики УФИЦ РАН, г. Уфа), выделенный из клубеньков люцерны посевной. Чистую культуру *E. meliloti* наращивали в чашках Петри на твердой питательной среде УМ при 28°C до завершения экспоненциальной фазы роста. Для выделения липополисахаридов использовали описанный нами ранее способ, заключающийся в получении ЛПС с помощью жидкостной колоночной хроматографии в модификации, исключавшей этап фенольной экстракции ЛПС из биомассы. Принадлежность полученных в ходе выделения веществ к ЛПС была подтверждена спектроскопией ЯМР ¹H [16].

Исследование биологической активности фракций ЛПС *E. meliloti* проводили на 60 беспородных крысах-самцах (231±27 г) из уфимского питомника (страна происхождения — Польша). Экспериментальные животные содержались в стандартных условиях вивария ФГБОУ ВО БГМУ Минздрава России с естественным световым режимом, на стандартном рационе питания, со свободным доступом к воде и пище. Все манипуляции с лабораторными животными проводились с соблюдением приказа № 742 Министерства высшего и среднего специального образования СССР от 13 ноября 1984 г. «Об утверждении Правил проведения работ с использованием экспериментальных животных». Животные были разделены на 6 групп (n = 10) для каждого эксперимента случайным образом, с использованием в качестве критерия массы тела (табл. 1).

Иммунодефицитное состояние лабораторных животных индуцировали с помощью цитостатика — циклофосфида (ЦФ) в форме лекарственного препарата «Эндоксан» (Baxter, США) в дозе 50 мг/кг, за 24 ч до введения образцов исследуемого биологического материала.

Исследуемые фракции ЛПС *E. meliloti* вводили внутривенно через 24 ч после инъекции ЦФ и предварительного разведения в физиологическом растворе — ежедневно в течение 21 дня в физиологической для крыс дозе 0,1 мг/кг. Препаратом сравнения для оценки иммуномодулирующей активности служил «Ликопид» (ЗАО «Пептек», Россия) в терапевтической дозе в 0,2 мг/кг.

На 22-е сутки лабораторные животные выводились из эксперимента посредством эвтаназии в эксикаторе передозировкой диэтилового эфира для наркоза, после чего каждую крысу подвергали аутопсии с последующим морфометрическим исследованием органов. В дальнейшем парафиновые срезы паренхиматозных органов окрашивались гематоксилин-эозином и исследовались гистологически посредством световой микроскопии.

Для статистической обработки данных применялись непараметрические методы, для описания количественных признаков в малых выборках — медиана (Me) и интерквартильный размах (Q1–Q3), для расчета статистической значимости различий количественных признаков между группами — непараметрический критерий Манна–Уитни для двух независимых групп. Отличия считались статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты

Из *Ensifer meliloti* было получено 3 фракции ЛПС — ЛПС-1, ЛПС-2, ЛПС-3, принадлежность которых к липополисахаридам была подтверждена спектроскопией ЯМР ¹H. Спектр одной из фракций показан на рис. 1.

Все 3 фракции выходили из колонки на этапе элюции смесью этанол–триэтиламин, хорошо растворялись в воде и имели спектры ЯМР ¹H, идентичные по сигналам, но различавшиеся по интегральной интенсивности пиков. Последнее могло быть обусловлено различной степенью редукции олигосахаридной части молекулы ЛПС. Наименее редуцированной по углеводному фрагменту являлась фракция ЛПС-2, однако для дальнейшей работы были взяты все три фракции ЛПС.

Морфометрическая характеристика

Установлено, что при введении циклофосфида лабораторным животным по окончании периода наблюдения имело место незначительное снижение массы печени и почек; вес сердца и селезенки оставался неизменным (в сравнении с интактными животными). Однако указанные изменения были статистически не значимы. Статистически достоверно у иммунодефицитных крыс в сравнении с показателями контрольной группы увеличивался лишь вес легких (табл. 2).

Намного более выраженные изменения весовых характеристик внутренних органов имели место при введении иммунодефицитным крысам исследуемых фракций ЛПС и препарата сравнения («Ликопид»). Так, введение ЛПС-2, ЛПС-3 или «Ликопида» сопровождалось достоверным и сопоставимым увеличением мас-

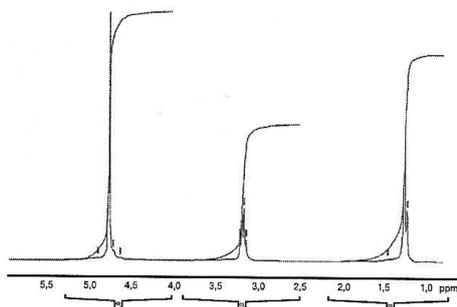


Рисунок 1. Спектр ЯМР ^1H фракции ЛПС-3 *E. meliloti*

Figure 1. NMR spectrum ^1H of *E. meliloti* LPS-3 fraction

Примечание. В полученном спектре наблюдались характерные сигналы протонов жирнокислотных остатков при 1,3 м.д. (группа протонов I), CH_2 -групп, сопряженных с полярными фрагментами, при 3,2 м.д. (группа протонов II) и протонов углеводных остатков при 4,8 м.д. (группа протонов III).

Note. The spectrum obtained, demonstrated characteristic signals of fatty acid residues protons were observed at 1.3 ppm. (group of protons I), CH_2 -groups conjugated with polar fragments, at 3.2 ppm (group of protons II) and protons of carbohydrate residues at 4.8 ppm (group of protons III).

сы и печени и почек до их нормальных значений, наблюдавшихся у интактных животных (табл. 2).

Вес легких за период наблюдения не восстанавливался до нормальных значений и был сопоставим с массой этого органа в группе животных с индуцированным иммунодефицитом (табл. 2).

Вес селезенки оставался неизменным и достоверно не менялся как в группе интактных животных, так и в группах сравнения (табл. 2).

Масса сердца достоверно увеличилась только в группе животных с иммунодефицитом, которым вводился «Ликопид», тогда как у интактных, иммунодефицитных без коррекции (группа 2) и иммунодефицитных животных, которым вводили все исследованные фракции ЛПС или «Ликопид», вес сердца оставался без значимого изменения (табл. 2).

Намного более существенные реактивные изменения были обнаружены при гистологическом исследовании паренхиматозных органов иммунодефицитных животных.

Гистологическая характеристика

Селезенка. В контрольной группе рисунок органа был сохранен. Так, ткань селезенки была представлена крупными фолликулами с умеренным количеством лимфоидных муфт и полнокровием красной пульпы, что соответствовало норме. В группе животных с индуцированным

иммунодефицитом отмечалось подавление лимфоидной ткани с редукцией фолликулов за счет мантийной зоны, атрофией лимфоидных муфт в строме органа и отсутствием герминативных центров. При введении иммунодефицитным животным «Ликопид» морфологически формировалось состояние умеренной гиперплазии фолликулов селезенки с увеличением количества герминативных центров и вторичных фолликулов (рис. 2, II обложка).

При введении животным отдельных фракций ЛПС на фоне иммунодефицита существенных различий между фракциями не было. Однако в целом при введении ЛПС в сравнении с «Ликопидом» увеличение количества фолликулов селезенки с крупными герминативными центрами, расширением мантийной зоны, увеличением вторичных фолликулов и появлением лимфоидных муфт в строме органа было более выраженным. Это свидетельствует о том, что при введении ЛПС на фоне иммунодефицита в селезенке имеет место лимфоидная гиперплазия и активируется иммунный ответ (рис. 2, II обложка).

Печень. Ткань печени в контрольной группе животных была сохранена. Центральные вены долек малокровные, в портальных трактах обнаруживалась незначительная лимфоидная инфильтрация. В печени интактных животных с иммунодефицитом гистологически отмечена выраженная лимфоидная инфильтрация в портальных трактах. Аналогичная гистологическая картина имела место и в группе иммунодефицитных животных, которым вводили «Ликопид», характеризовавшаяся полнокровием сосудов и отеком стромы. В отличие от вышеуказанного в группе животных с индуцированным иммунодефицитом при введении ЛПС лимфоидная инфильтрация в портальных трактах была незначительной, сосуды были малокровными, что приближает подобную картину к норме, наблюдавшейся в контрольной группе (рис. 3, III обложка).

Легкие. В легких животных контрольной группы отмечается лимфоидная перибронхиальная и периваскулярная инфильтрация легочной ткани, в большей степени обусловленная воздействием эфира для вывода животных из эксперимента. В группе интактных иммунодефицитных животных, напротив, гистологически имело место подавление и уменьшение лимфоидной ткани, характеризовавшееся отсутствием лимфоидных муфт. В противоположность этому в группе, получавшей «Ликопид», обнаруживалось полнокровие сосудов и капилляров межальвеолярной перегородки, а также умеренная гиперплазия лимфоидной ткани. В группе иммунодефицитных животных, которым вводили ЛПС, имело место полнокро-

Таблица 1. Описание экспериментальных групп

Table 1. Description of experimental groups

Номер группы Group number	Обозначение Name of groups	Описание Description
Группа 1 Group 1	Интактная группа Intact group	Ничего не вводили No injections
Группа 2 Group 2	Контрольная группа Control group	Одноразовая внутрибрюшинная инъекция ЦФ + 21 день вводили воду Single intraperitoneal injection of cyclophosphamide + 21 days of water injection
Группа 3 Group 3	ЛПС <i>Ensifer meliloti</i> , фракция 1 LPS <i>Ensifer meliloti</i> , fraction No. 1	Одноразовая внутрибрюшинная инъекция ЦФ + 21 день вводили ЛПС <i>Ensifer meliloti</i> , фракция 1 Single intraperitoneal injection of cyclophosphamide + 21 days of/LPS <i>Ensifer meliloti</i> fraction No. 1 injection
Группа 4 Group 4	ЛПС <i>Ensifer meliloti</i> , фракция 2 LPS <i>Ensifer meliloti</i> , fraction No. 2	Одноразовая внутрибрюшинная инъекция ЦФ + 21 день вводили ЛПС <i>Ensifer meliloti</i> , фракция 2 Single intraperitoneal injection of cyclophosphamide + 21 days of/LPS <i>Ensifer meliloti</i> fraction No. 2 injection
Группа 5 Group 5	ЛПС <i>Ensifer meliloti</i> , фракция 3 LPS <i>Ensifer meliloti</i> , fraction No. 3	Одноразовая внутрибрюшинная инъекция ЦФ + 21 день вводили ЛПС <i>Ensifer meliloti</i> , фракция 3 Single intraperitoneal injection of cyclophosphamide + 21 days of/LPS <i>Ensifer meliloti</i> fraction No. 3 injection
Группа 6 Group 6	«Ликопид» Licopid	Одноразовая внутрибрюшинная инъекция ЦФ + 21 день вводили «Ликопид» Single intraperitoneal injection of cyclophosphamide + 21 days of Licopid injection

вие сосудов и капилляров межальвеолярной перегородки, как и при введении «Ликопида». Однако наряду с этим была обнаружена гиперплазия лимфоидной ткани с крупными герминативными центрами, что говорит об активации иммунного ответа (рис. 4, III обложка).

Обсуждение

Сепсис-индуцирующие эффекты ЛПС к настоящему моменту достаточно полно охарактеризованы [1, 2, 3, 4]. Однако, учитывая, что источником ЛПС является большое количество представителей грамотрицательной микрофлоры, сопровождающей человека на протяжении всей его жизни и не вызывающей при этом септических состояний [12], представляется логичным предположение о существовании предшествующих этапов, на которых ЛПС может оказывать отличающиеся по силе и характеру биологические эффекты. Их регистрация даже в эксперименте при введении ЛПС в критических, приводящих к системному воспалительному ответу условиях проблематична. В связи с этим первым постулатом, исходя из которого планировалось данное исследование, стало изучение не цельных препаратов бактериальных липополисахаридов, а их отдельных фракций.

Вторым постулатом, на котором выстраивалась логика исследования, было понимание быстротечности, силы и многообразия эффектов ЛПС при развитии сепсиса в силу их цитокин-

опосредованного механизма, что практически исключало возможность регистрации досептических эффектов физиологических концентраций ЛПС или их фракций. Указанное послужило основанием для рассмотрения связей между эффектами исследуемых соединений и морфологическими изменениями органов, которые при сепсисе становятся основной ареной системного воспалительного ответа и одновременно отличаются большей стабильностью.

В результате проведенных исследований показано, что при внутрибрюшинном введении фракций ЛПС изменения весовых характеристик преимущественно касались наиболее интенсивно кровоснабжаемых органов — печени и почек. Это указывает на системный характер их эффектов. Однако восстановление их веса до нормальных значений на фоне иммунодефицита при введении крысам исследуемых фракций ЛПС и препарата сравнения («Ликопид») может отражать их компенсаторный физиологический характер (табл. 2).

Гистологически установлено, что при внутрибрюшинном введении циклофосфамида вторичное иммунодефицитное состояние обуславливается не только снижением функциональной активности лимфоидных клеток, как было показано ранее [13], но и вполне конкретными морфологическими изменениями органов, прямо или косвенно задействованных в реализации иммунного ответа. Так, угнетение лимфоидной ткани было отмечено в селе-

Таблица 2. Влияние фракций липополисахарида *E. meliloti* на весовые характеристики паренхиматозных органов крыс

Table 2. Influence of *E. meliloti* lipopolysaccharide fractions on the weight characteristics in rat parenchymal organs

Показатель Measure	Группы крыс/Groups of rats					
	1 (n = 10) Интактные Intact group	2 (n = 10) Контроль без лечения Control	3 (n = 10) ЛПС-1 LPS-1	4 (n = 10) ЛПС-2 LPS-2	5 (n = 10) ЛПС-3 LPS-3	6 (n = 10) «Ликопид» Licopid
Селезенка/Spleen						
M±σ Me/[Q1-Q3]	1,1±0,262 1,05/[1,0-1,3]	1,05±0,255 1,1/[0,9-1,3] p ₁₋₂ = 0,816	1,08±0,27 1,1/[0,8-1,3] p ₂₋₃ = 0,734	1,15±0,19 1,2/[0,9-1,3] p ₂₋₄ = 0,473	1,16±0,384 1,1/[0,8-1,5] p ₂₋₅ = 0,597	1,17±0,149 1,2/[1,1-1,3] p ₂₋₆ = 0,406
Печень/Liver						
M±σ Me/[Q1-Q3]	9,1±1,179 9,55/[8,0-10,1]	7,95±1,58 7,5/[7,2-9,4] p ₁₋₂ = 0,088	9,25±1,869 9,05/[8,3-9,5] p ₂₋₃ = 0,226	10,21±1,371 9,8/[9,7-10,0] p ₂₋₄ = 0,004	9,88±1,734 9,7/[8,8-10,7] p ₂₋₅ = 0,026	9,67±1,164 9,85/[8,7-10,4] p ₂₋₆ = 0,023
Почки/Kidney						
M±σ Me/[Q1-Q3]	1,63±0,2 1,65/[1,5-1,7]	1,54±0,217 1,5/[1,4-1,7] p ₁₋₂ = 0,283	1,68±0,235 1,6/[1,5-1,8] p ₂₋₃ = 0,174	1,74±0,171 1,75/[1,7-1,8] p ₂₋₄ = 0,026	1,77±0,231 1,8/[1,5-1,9] p ₂₋₅ = 0,045	1,93±0,206 1,9/[1,8-2,1] p ₂₋₆ = 0,003
Сердце/Heart						
M±σ Me/[Q1-Q3]	0,87±0,106 0,9/[0,8-0,9]	0,91±0,099 0,9/[0,9-0,9] p ₁₋₂ = 0,231	0,87±0,142 0,8/[0,8-0,8] p ₂₋₃ = 0,212	0,84±0,126 0,8/[0,8-0,8] p ₂₋₄ = 0,104	0,99±0,202 0,95/[0,8-1,2] p ₂₋₅ = 0,496	1,05±0,158 1,0/[0,9-1,1] p ₂₋₆ = 0,038
Легкие/Lungs						
M±σ Me/[Q1-Q3]	1,96±0,303 1,85/[1,7-2,1]	2,29±0,415 2,2/[2,0-2,5] p ₁₋₂ = 0,047	2,210±0,57 2,15/[1,9-2,5] p ₂₋₃ = 0,571	2,07±0,291 2,0/[1,8-2,2] p ₂₋₄ = 0,212	2,44±0,465 2,35/[2,3-2,8] p ₂₋₅ = 0,326	2,55±0,314 2,6/[2,3-2,8] p ₂₋₆ = 0,089

Примечания. Различия статистически значимы ($p < 0,05$) при сравнении показателей: p₁₋₂ — интактной и контрольной групп; p₂₋₃ — контрольной и 3 групп; p₂₋₄ — контрольной и 4 групп; p₂₋₅ — контрольной и 5 групп; p₂₋₆ — контрольной и 6 групп.
Notes. Differences are statistically significant ($p < 0,05$) while comparing parameters between: p₁₋₂ — intact and control groups; p₂₋₃ — control group and 3rd groups; p₂₋₄ — control group with 4th group; p₂₋₅ — control group and 5th group; p₂₋₆ — control group with 6th group.

зенке, печени и легких лабораторных животных, у которых при введении циклофосамида наблюдали достаточно схожие гистологические изменения.

Вместе с тем компенсаторные механизмы ответных реакций указанных паренхиматозных органов, инициируемых исследуемыми в данной работе иммунорегуляторными соединениями, имели гистологическую специфику.

Так, в селезенке морфологические изменения, связанные с введением «Ликопида» и исследуемых фракций ЛПС, были наиболее выраженными. При введении ЛПС в сравнении с «Ликопидом» имело место более значительное повышение количества фолликулов селезенки с крупными герминативными центрами и расширением мантийной зоны, увеличением вторичных фолликулов и с образованием лимфоидных муфт в строме органа, что в совокупности указывает на лимфоидную гиперплазию, наблюдаемую при активации иммунореактивности.

В печени экспериментальных животных на фоне индуцированного иммунодефицита

преимущественно отмечалось снижение интенсивности кровоснабжения и выраженная лимфоидная инфильтрация в портальных трактах. При введении «Ликопида» на фоне иммунодефицита кровоснабжение органа становилось избыточным, что сопровождалось последующим отеком стромы. Тогда как при введении ЛПС лимфоидная инфильтрация в портальных трактах была незначительной, сосуды были малокровными, что соответствовало картине, наблюдавшейся в контрольной группе.

В ткани легкого, как и в печени, при введении «Ликопида» отмечалось полнокровие сосудов и капилляров межальвеолярной перегородки, а также умеренная гиперплазия лимфоидной ткани. В группе иммунодефицитных животных, которым вводили ЛПС, как и при введении «Ликопида», имело место полнокровие сосудов и капилляров межальвеолярной перегородки. Однако наряду с этим имела место выраженная гиперплазия лимфоидной ткани с крупными герминативными центрами, что также указывало на активацию иммунного ответа.

Таким образом, представленные экспериментальные данные могут служить достаточно весомым и, что важно, воспроизводимым доказательством физиологических эффектов системной ЛПС-опосредованной эндотоксинемии, прикладные перспективы которых, на наш взгляд, очевидны.

Благодарности

Работа выполнена при финансовой поддержке фонда содействия развитию малых форм предприятий в научно-технической сфере по программе «УМНИК-Хелснет-НТИ-2017», Москва.

Список литературы/References

1. Дентовская С.В., Платонов М.Е., Бахтеева И.В., Анисимов А.П. Наличие полной структуры кора липополисахарида необходимо для активации плазминогена возбудителя чумы // Проблемы особо опасных инфекций. 2007. Вып. 93. С. 49–51. [Dentovskaya S.V., Platonov M.E., Bakhteyeva I.V., Anissimov A.P. The presence of the complete lipopolysaccharide core structure is necessary for the activation of *Yersinia pestis* plasminogen. *Problemy osobo opasnykh infektsiy = Problems of Particularly Dangerous Infections*, 2007, iss. 93, pp. 49–51. (In Russ.)]
2. Дентовская С.В., Платонов М.Е., Комбарова Т.И., Титарева Г.М., Бахтеева И.В., Шайхутдинова Р.З., Иванов С.А., Анисимов А.П. Укорочение кора липополисахарида снижает вирулентность *Yersinia pestis* // Проблемы особо опасных инфекций. 2009. Вып. 99. С. 50–51. [Dentovskaya S.V., Platonov M.E., Kombarova T.I., Titareva G.M., Bakhteyeva I.V., Shaikhutdinova R.Z., Ivanov S.A., Anisimov A.P. Truncation of lipopolysaccharide core decreases *Yersinia pestis* virulence. *Problemy osobo opasnykh infektsiy = Problems of Particularly Dangerous Infections*, 2009, iss. 99, pp. 50–51. (In Russ.)]
3. Книрель Ю.А., Анисимов А.П. Липополисахарид чумного микроба *Yersinia pestis*: структура, генетика, биологические свойства // Acta naturae. 2012. Т. 4, № 3 (14). С. 49–61. [Knirel' Yu.A., Anisimov A.P. Lipopolysaccharide of *Yersinia pestis*, the cause of plague: structure, genetics, biological properties. *Acta naturae*, 2012, vol. 4, no. 3 (14), pp. 49–61. (In Russ.)]
4. Инфекции и воспаления в урологии. Под ред. Глыбочко П.В., Коган М.И., Набока Ю.Л. М.: Медфорум, 2019. 888 с. [Infections and inflammations in urology. Eds. Glybochko P.V., Kogan M.I., Naboka Yu.L. Moscow: Medforum, 2019. 888 p. (In Russ.)]
5. Мавзютов А.Р., Бондаренко К.Р., Еникеев А.Н., Бондаренко В.М. Системная эндотоксинемия как патогенетический фактор осложнения беременности // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. 2012. № 5. С. 16–21. [Mavzyutov A.R., Bondarenko K.R., Enikeev A.N., Bondarenko V.M. System endotoxemia as a pathogenetic factor of the complications of pregnancy. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunologii = Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*, 2012, vol. 5, pp. 16–21. (In Russ.)]
6. Мавзютов А.Р., Князева О.А., Гарафутдинов Р.Р., Габдрахманова А.Р. Влияние липополисахарида *Escherichia coli* на фагоцитарную и метаболическую активность нейтрофилов крови мышей с индуцированным иммунодефицитом // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. 2017. № 3. С. 84–90. [Mavzyutov A.R., Knyazeva O.A., Garafutdinov R.R., Gabdrakhmanova A.R. Effect of lipopolysaccharide of *Escherichia coli* on phagocyte and metabolic activity of mice blood neutrophils with induced immune deficiency. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunologii = Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*, 2017, vol. 3, pp. 84–90. (In Russ.)]
7. Мавзютова Г.А., Фазлыева Р.М., Мавзютов А.Р., Хайруллина Р.М., Акбашева А.О., Кузовкина О.З. Состояние антиэндотоксиновой защиты при внебольничной пневмонии // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. 2010. № 4. С. 65–71. [Mavzyutova G.A., Fazlyeva R.M., Mavzyutov A.R., Khairullina R.M., Kuzovkina O.Z. The state of anti-endotoxine defence in the Community acquired pneumonia. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunologii = Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*, 2010, vol. 4, pp. 65–71. (In Russ.)]
8. Машков О.И., Гарафутдинов Р.Р., Мавзютов А.Р. Выделение препаративных количеств липополисахаридов *E. coli* методом жидкостной колоночной хроматографии // Вестник Башкирского университета. 2017. Вып. 22, № 2. С. 351–355. [Mashkov O.I., Garafutdinov R.R., Mavzyutov A.R. Preparative extraction of *E. coli* lipopolysaccharide by liquid column chromatography. *Vestnik Bashkirskogo universiteta = Bulletin of Bashkir University*, 2017, vol. 22, no. 2, pp. 351–355. (In Russ.)]
9. Салахов И.М., Аниховская И.А., Майский И.А., Маркелова М.М., Окорок П.Л., Хасанова Г.Р., Юркин В.А. Нормативные показатели системной эндотоксинемии как базисный элемент определения роли липополисахаридов кишечной микрофлоры в общей патологии // Патогенез. 2015. Вып. 13, № 1. С. 18–27. [Salakhov I.M., Anihovskaya I.A., Maysky I.A., Markelova M.M., Okorokov P.L., Hasanova G.R., Jurkiv V.A. The normative data of systemic endotoxemia as the basic element of role definition of lipopolysaccharides of gut organisms in general pathology. *Patogenez = Pathogenesis*, 2015, iss. 13, no. 1, pp. 18–27. (In Russ.)]
10. Aldapa-Vega G., Pastelín-Palacios R., Isibasi A., Moreno-Eutimio M.A., López-Macias C. Modulation of immune response by bacterial lipopolysaccharides. *Rev. Alerg. Mex.*, 2016, vol. 63, no. 3, pp. 293–302. doi: 10.29262/ram.v63i3.207
11. Cohen J., Vincent J.L., Adhikari N.K., Machado F.R., Angus D.C., Calandra T., Jaton K., Giulieri S., Delaloye J., Opal S., Tracey K., van der Poll T., Pelfrene E. Sepsis: a roadmap for future research. *Lancet Infect. Dis.*, 2015, vol. 15, no. 5, pp. 581–614. doi: 10.1016/S1473-3099(15)70112-X
12. Copeland S., Warren H.S., Lowry S.F., Calvano S.E., Remick D. Acute inflammatory response to endotoxin in mice and humans. Inflammation and the host response to injury investigators. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, 2005, vol. 12, no. 1, pp. 60–67. doi: 10.1128/CDLI.12.1.60-67.2005
13. Geddes B.A., Oresnik I.J. Physiology, genetics, and biochemistry of carbon metabolism in the alphaproteobacterium *Sinorhizobium meliloti*. *Can. J. Microbiol.*, 2014, vol. 60, no. 8, pp. 491–507. doi: 10.1139/cjm-2014-0306
14. Grasselli C., Ferrari D., Zalfa C., Soncini M., Mazzocchi G., Facchini F.A., Marongiu L., Granucci F., Copetti M., Vescovi A.L., Peri F., De Filippis L. Toll-like receptor 4 modulation influences human neural stem cell proliferation and differentiation. *Cell Death Dis.*, 2018, vol. 9, no. 3: 280. doi: 10.1038/s41419-017-0139-8

15. Vincent J.L., Sakr Y., Sprung C.L., Ranieri V.M., Reinhart K., Gerlach H., Moreno R., Carlet J., Le Gall J.R., Payen D. Sepsis in European intensive care units: results of the SOAP study. Sepsis occurrence in acutely ill patients investigators. *Crit. Care Med.*, 2006, vol. 34, no. 2, pp. 344–353. doi: 10.1097/01.CCM.0000194725.48928.3A
16. Vincent J.L., Rello J., Marshall J., Silva E., Anzueto A., Martin C.D., Moreno R., Lipman J., Gomersall C., Sakr Y., Reinhart K.; EPIC II Group of Investigators. International study of the prevalence and outcomes of infection in intensive care units. *JAMA*, 2009, vol. 302, no. 2, pp. 2323–2329. doi:10.1001/jama.2009.1754
17. Wiersinga W.J., van der Poll T. Sepsis: new insights into its pathogenesis and treatment. *Ned. Tijdschr. Geneesk.*, 2010, vol. 154: A1130.

Авторы:

Мавзютов А.Р., д.м.н., профессор, зав. кафедрой фундаментальной и прикладной микробиологии, профессор кафедры лабораторной диагностики ИДПО ФГБОУ ВО Башкирский государственный медицинский университет МЗ РФ, г. Уфа, Россия;
Глазутдинова Л.Р., студентка 4 курса медико-профилактического факультета с отделением биологии ФГБОУ ВО Башкирский государственный медицинский университет МЗ РФ, г. Уфа, Россия;
Саньчиков Д.В., студент 4 курса медико-профилактического факультета с отделением биологии ФГБОУ ВО Башкирский государственный медицинский университет МЗ РФ, г. Уфа, Россия;
Щекин В.С., аспирант кафедры патологической анатомии ФГБОУ ВО Башкирский государственный медицинский университет МЗ РФ, г. Уфа, Россия;
Гарафутдинов Р.Р., зав. лабораторией физико-химических методов анализа биополимеров Института биохимии и генетики УФИЦ РАН, г. Уфа, Россия;
Чижова А.В., ассистент кафедры патологической анатомии ФГБОУ ВО Башкирский государственный медицинский университет МЗ РФ, г. Уфа, Россия;
Габдрахманова А.Р., биолог клинико-диагностической лаборатории ГБУЗ Городская клиническая больница № 13, г. Уфа, Россия.

Поступила в редакцию 05.07.2019
 Отправлена на доработку 26.11.2019
 Принята к печати 14.03.2020

Authors:

Mavzyutov A.R., PhD, MD (Medicine), Professor, Head of Fundamental and Applied Microbiology Department, Bashkir State Medical University, Ufa, Russian Federation;
Glazutdinova L.R., 4-year Student, Department of Preventive Medicine and Biology, Bashkir State Medical University, Ufa, Russian Federation;
Sanchokov D.V., 4-year Student, Department of Preventive Medicine and Biology, Bashkir State Medical University, Ufa, Russian Federation;
Shekin V.S., PhD Student, Department of Pathoanatomy, Bashkir State Medical University, Ufa, Russian Federation;
Garafutdinov R.R., Head of the Laboratory of Physical-Chemical Methods of Analysis of Biopolymers of Institute of Biochemistry and Genetics, Federal Research Center Russian Academy of Sciences, Ufa, Russian Federation;
Chizhova A.V., Assistant Professor, Department of Pathoanatomy, Bashkir State Medical University, Ufa, Russian Federation;
Gabdrakhmanova A.R., Biologist, Clinical Diagnostic Laboratory, City Clinical Hospital No. 13, Ufa, Russian Federation.

Received 05.07.2019
 Revision received 26.11.2019
 Accepted 14.03.2020

Иллюстрации к статье «Морфометрическая характеристика эффектов фракций липополисахарида *Ensifer meliloti* на паренхиматозные органы лабораторных крыс с вторичным иммунодефицитом» (авторы: А.Р. Мавзютов, Л.Р. Глазутдинова, Д.В. Саньчиков, В.С. Щекин, Р.Р. Гарафутдинов, А.В. Чижова, А.Р. Габдрахманова) (с. 93–100)

Illustrations for the article "Morphometric characteristics of effects induced by *Ensifer meliloti* lipopolysaccharide fractions on parenchymatous organs in laboratory rats with secondary immunodeficiency" (authors: Mavzyutov A.R., Glazutdinova L.R., Sanchokov D.V., Shchekin V.S., Garafutdinov R.R., Chizhova A.V., Gabdrakhmanova A.R.) (pp. 93–100)

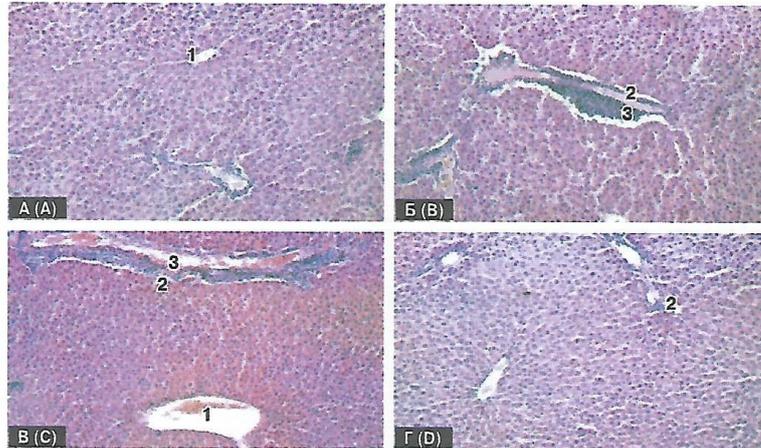


Рисунок 3. Гистологическая картина печени

Figure 3. The histological images of liver

A — контрольная группа, Б — группа иммунодефицит, В — группа «Ликопид», Г — группа ЛПС. 1 — центральная вена долек, 2 — портальный тракт, 3 — лимфоидный инфильтрат. Световая микроскопия. Увеличение ×100. Окраска: гематоксилин-эозин.

A — control group, B — immunodeficient group, C — Licopid group, D — LPS group. 1 — central vein of liver, 2 — portal area, 3 — lymphoid infiltration. Light microscopy. Objective magnification × 100. Staining: HE.

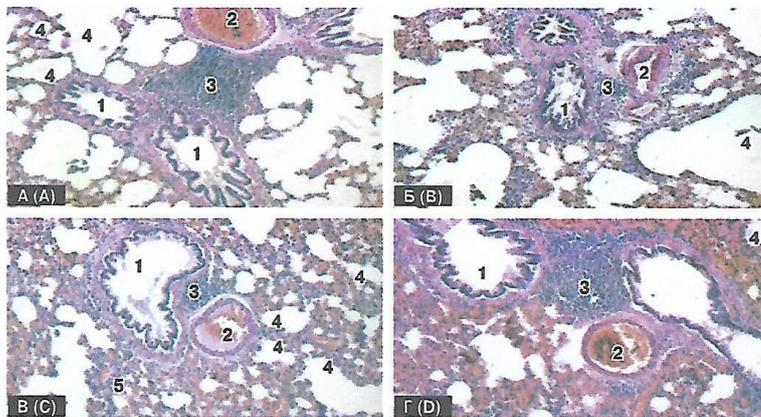


Рисунок 4. Гистологическая картина легких

Figure 4. The histological images of lungs

A — контрольная группа, Б — группа иммунодефицит, В — группа «Ликопид», Г — группа ЛПС. 1 — бронх, 2 — артерия, 3 — мантийная зона, 4 — альвеолы, 5 — межальвеолярные перегородки. Световая микроскопия. Увеличение ×100. Окраска: гематоксилин-эозин.

A — control group, B — immunodeficient group, C — Licopid group, D — LPS group. 1 — bronchus, 2 — arteria, 3 — mantle zone, 4 — alveoli, 5 — interalveolar septum. Light microscopy. Objective magnification ×100. Staining: HE.

Иллюстрации к статье «Морфометрическая характеристика эффектов фракций липополисахарида *Ensifer meliloti* на паренхиматозные органы лабораторных крыс с вторичным иммунодефицитом» (авторы: А.Р. Мавзютов, Л.Р. Глазутдинова, Д.В. Саньчиков, В.С. Щекин, Р.Р. Гарафутдинов, А.В. Чижова, А.Р. Габдрахманова) (с. 93–100)

Illustrations for the article "Morphometric characteristics of effects induced by *Ensifer meliloti* lipopolysaccharide fractions on parenchymatous organs in laboratory rats with secondary immunodeficiency" (authors: Mavzyutov A.R., Glazutdinova L.R., Sanchokov D.V., Shchekin V.S., Garafutdinov R.R., Chizhova A.V., Gabdrakhmanova A.R.) (pp. 93–100)

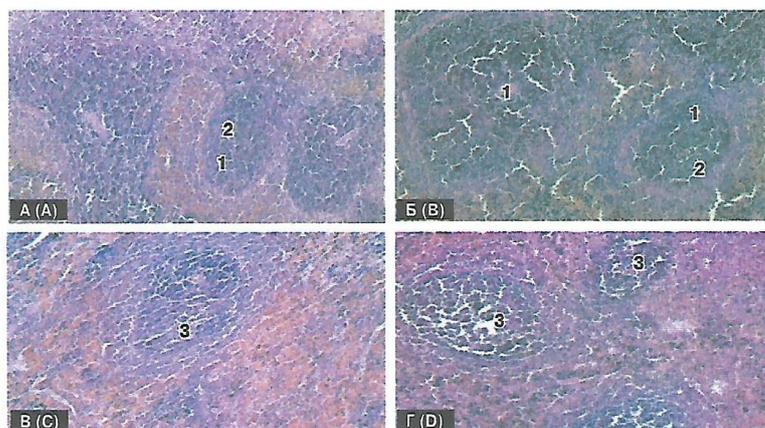


Рисунок 2. Гистологическая картина селезенки

Figure 2. The histological image of the spleen

A — контрольная группа, Б — группа иммунодефицит, В — группа «Ликопид», Г — группа ЛПС. 1 — лимфоидный фолликул, 2 — мантийная зона, 3 — герминативный центр. Световая микроскопия. Увеличение ×100. Окраска: гематоксилин-эозин.

A — control group, B — immunodeficient group, C — Licopid group, D — LPS group. 1 — lymphoid follicle, 2 — mantle zone, 3 — germinal center. Light microscopy. Objective magnification ×100. Staining: HE.

УДК 592

Д.В. Саньчоков, Г.Р. Ахметова

ИЗУЧЕНИЕ ИНВАЗИРОВАННОСТИ КОМАРОВ ЛИЧИНКАМИ ДИРОФИЛЯРИЙ

Научный руководитель – д.м.н., профессор Г.И. Лукманова, ст. преподаватель А.Т. Волкова

Кафедра биологии, Башкирский государственный медицинский университет, г Уфа

Резюме. Проведено исследование инвазированности комаров микрофиляриями *Dirofilaria repens* в г. Уфе и селе Дмитриевка Уфимского района. Анализ результатов показал, что: в городской и сельской местности РБ встречаются комары родов *Culex L.*, *Aedes Mg.* и *Anopheles Mg.* Личинки *Dirofilaria* обнаружены у самок комаров рода *Culex L.*, *Aedes Mg.* и *Anopheles Mg.* Общая инвазированность всех исследуемых комаров составила 8,8%. Показатель пораженности комаров дирофиляриями больше у рода *Aedes*; риск заражения дирофиляриозом человека в городе выше, чем в селе.

Ключевые слова: *Dirofilaria*, инвазия комаров дирофиляриозом.

D.V. Sanchokov, G.R. Akhmetova

A STUDY OF INFESTATION OF MOSQUITO LARVAE DIROFILARIA

Scientific Advisor – Ph. D. in Medicine, Full professor G.I. Lukmanova, A.T. Volkova

Department of Biology, Bashkir State Medical University, Ufa

Abstract. A study of infestation of mosquito larvae *Dirofilaria repens* in Ufa and the village of Dmitrievka, Ufa district. Analysis of the results showed that: in urban and rural areas there are mosquitoes of the general *Culex L.*, *Aedes Mg.* and *Anopheles Mg.* Larvae of *Dirofilaria* detected in female mosquitoes of the genus *Culex L.*, *Aedes Mg.* and *Anopheles Mg.* The total contamination of all investigated mosquitoes was 8.8%. The rate of infection of mosquitoes by dirofilaria more in the genus *Aedes*; the risk of Contracting dirofilariosis person in the city than in the village.

Keywords: *Dirofilaria*, invasion of mosquito dirofilariosis

Актуальность: Дирофиляриоз – паразитарное заболевание, вызываемое круглым червем отряда *Spirurina*, семейства *Filarioidea*, рода *Dirofilaria* [4]. Заражение человека происходит через укусы кровососущих комаров. Дефинитивными хозяевами обычно являются домашние собаки, кошки и реже дикие животные [1]. Этому гельминтозу начали уделять повышенное внимание последние десятилетия в России в связи с участвовавшими случаями обращений инвазированных больных. Истинный показатель заболеваемости людей не определен, поскольку официальная регистрация этого гельминтоза не проводится. Дирофиляриоз у человека часто проходит под различными диагнозами непаразитарной этиологии вследствие слабой информированности врачей. В настоящее время установить риск заражения человека

трудно из-за недостаточного анализа эпидемиологии и эпизоотологии дирофиляриоза во всех регионах России, в том числе и в Республике Башкортостан (РБ) [2].

Цель исследования: Изучить инвазированность личинками дирофилярий комаров городской и сельской местности Республики Башкортостан.

Материалы и методы: Материалом для исследования послужили самки комаров родов *Anopheles*, *Culex*, *Aedes*, отловленные в г. Уфе и его окрестностях (июнь 2016 г.). Отлов проводился в г. Уфе на левом берегу р. Уфимки: (ост. Трамплин); в с. Дмитриевка Уфимского района РБ, в микрорайоне Дема (Лесной кордон). Отловленных насекомых фиксировали в растворе Барбагола.

Для дифференциации вида и пола комаров изучали морфологию нижнечелюстных щупиков и усиков, а так же окраску тела под световым микроскопом ($\times 80$) [3].

Для самок комаров рода *Culex* Свойственно: небольшие щупики, усики с короткими волосками, брюшко и конечности темного цвета. Для самцов комаров рода *Culex* характерно: так же, как и у самок небольшие щупики, усики с длинными волосками, брюшко и конечности темного цвета.

Для самок рода *Aedes* присуще: небольшие щупики, усики с короткими волосками, брюшко светлого цвета, конечности пятнистые. Самцы комаров *Aedes* имеют: небольшие щупики, усики с длинными волосками, брюшко и конечности светлого цвета с пятнами.

У комаров с помощью пинцета вырывались хоботки, затем помещались на предметные стекла и окрашивались красителем Гимза. Далее хоботок при помощи скальпеля разделялся на мелкие фрагменты и рассматривался в микроскопе при объективе малого увеличения ($\times 600$) в капле физиологического раствора.

Среди фрагментов хоботка находили микрофилярий дирофилярии (*Dirofilaria repens*).

Результаты и обсуждение: Микрофилярии имели веретенообразную нитевидную форму тела, задним заостренным концом, длиной 0,2-0,4 мм, без чехлика.

Общая инвазированность всех исследуемых комаров составила 8,8% (в г. Уфе – 10,4%; в селе – 6,9%). Среди них выявлены микрофилярии у 8,2% *Culex*, 15,0% - *Aedes* и 6,7% - *Anopheles*. По данным литературы соотношение инвазированности комаров следующие: *Culex* - 17%, *Aedes* – 31% и *Anopheles* – 2,5% [1, 4]. Полученные результаты согласуются с данными литературы в том, что комары *Aedes* более поражены, чем *Culex*. Выявлено, что в комарах рода *Anopheles* реже всех встречаются личинки дирофилярий. У самцов личинки не обнаружены.

Изучение комаров г. Уфы показало, что 9,9% самок *Culex* и 17,2% *Aedes* инвазированы микрофиляриями. Значит, в городе комары *Aedes* более поражены микрофиляриями, чем *Culex* в 1,7 раз. В селе инвазированы самки *Culex* на 5,8%, *Aedes* – 12,9% и *Anopheles* – 6,7%. То есть самки *Aedes* чаще инвазированы, чем *Culex* в 2,2 раза и *Anopheles* – в 1,9. На основании полученных данных можно заключить, что наиболее инвазированы дирофиляриями комары рода *Aedes*, на втором месте по инвазированности комары рода *Culex*, на третьем *Anopheles*.

Заключение и выводы: Таким образом, показатель пораженности комаров дирофиляриями в городе отличается от сельской местности: самки *Culex* поражены чаще в 1,7 раза, *Aedes* – в 1,3 раза. Выводы: 1. В городской и сельской местности РБ встречаются комары родов *Culex*, *Aedes* и *Anopheles*; 2. Инвазированными личинками *Dirofilaria* могут быть самки комаров рода *Culex*, *Aedes* и *Anopheles*; 3. Общая инвазированность всех исследуемых комаров составила 8,8%; 4. Показатель пораженности комаров дирофиляриями больше у *Aedes*; 5. Риск заражения дирофиляриозом человека в городе выше чем в селе.

Список литературы:

1. Авдохина Т.И., Постнова В.Ф., Абросимова Л.М. и др. Дирофиляриоз (*Dirofilaria immitis*) в Российской Федерации и некоторых странах СНГ: ситуация и тенденции к изменению / Мед. Паразитол. – 2003. №4. – С. 44-48.
2. Лукманова Г.И., Волкова А.Т., Саньчиков Д.В., Белалова Г.В., Нижевич А.А.К вопросу о риске заражения дирофиляриозом на территории Республики Башкортостан. <http://fcrisk.ru/forums/node/400>
3. Мамаева Б.М. Определитель насекомых европейской части СССР. Учебное пособие для студентов биологических специальностей педагогических институтов. М., Просвещение. 1976.
4. Профилактика дирофиляриоза. Методические указания. МУ 3.2.188004 утв. Главным государственным санитарным врачом РФ 03.03.2004.