

**Влияние липополисахарида бактерий *Azospirillum irakense* КВС1 на индукцию синтеза цитокинов *in vivo* и *in vitro* фагоцитирующими макрофагами**

**А.А. Фомина<sup>1</sup>, О.Н. Коннова<sup>2</sup>, Е.И. Тихомирова<sup>1</sup>, С.А. Коннова<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> Саратовский государственный университет им. Н.Г. Чернышевского, Саратов

<sup>2</sup> Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, Саратов

Известно, что липополисахариды (ЛПС) бактерий являются индукторами ответных реакций макроорганизма, в том числе и синтеза цитокинов (Ройт А. и др. Иммунология – М: Мир, 2002). В связи с этим представлялось актуальным оценить способность к индукции провоспалительных цитокинов фагоцитирующими макрофагами на фоне действия ЛПС непатогенных штаммов бактерий. В качестве объекта исследования использовали ЛПС diaзотрофных ризобактерий из группы микроорганизмов, стимулирующих развитие растений - *Azospirillum irakense* КВС1. Ранее была изучена структура данного ЛПС. Анализ ЛПС<sub>КВС1</sub> методом ГЖХ выявил наличие в составе липида А оксикислот – 3-гидрокси-миристиновой и 3-гидроксипальмитиновой, которые составляли около 70 % веса всех метиловых эфиров жирных кислот, обнаруживаемых в ЛПС. Методом <sup>1</sup>Н- и <sup>13</sup>С-ЯМР спектроскопии было установлено (Konnova et al., Carbohydr. Research, V. 339. 2004), что О-ПС из ЛПС<sub>КВС1</sub> является регулярным разветвленными полисахаридом с гексасахаридными повторяющимся звеном: в основной цепи полисахарида содержатся галактоза и рамноза, от которой отходит тетрасахаридная боковая цепь из двух рамнозных остатков, одного маннозного и одного галактозного. Терминальный остаток галактозы представлен в фуранозной форме, в то время как все остальные сахара являются пиранозами.

Целью настоящей работы явилось изучение влияния ЛПС *Azospirillum irakense* КВС1 на индукцию синтеза макрофагами белых мышей провоспалительных эндогенных цитокинов: интерлейкина-1 (ИЛ-1) и фактора некроза опухоли альфа (ФНО-α) при фагоцитозе *in vitro* бактерий *Escherichia coli* Ca 52.

В опытах использовали контрольных (интактных) и опытных (иммунизированных ЛПС *A. irakense* КВС 1) беспородных белых мышей-самцов, весом 18-20 г, возраст - 2-3 месяца. Перитонеальные (ПМФ) и альвеолярные (АМФ) макрофаги выделяли из организма мышей стандартными методиками и использовали для моделирования фагоцитоза *in vitro* *Escherichia coli* Ca 52 (Практикум по иммунологии – М.: МГУ, 2001). Цитокины (ИЛ-1, ФНО-α) определяли в среде культивирования макрофагов с бактериями

в динамике процесса фагоцитоза иммуноферментным методом с тест-системами на основе моноклональных антител производства ООО «Цитокин» (г. Санкт-Петербург).

Установлено, что контрольные макрофаги продуцируют более высокие (на порядок) концентрации цитокина ИЛ-1 по сравнению с ФНО- $\alpha$  при фагоцитозе эшерихий. При этом содержание ИЛ-1 наиболее значительно увеличивалось до 100 пг/мл к 6 часам процесса фагоцитоза АМФ. Концентрация ФНО- $\alpha$  в среде культивирования АМФ и ПМФ в процессе фагоцитоза практически не изменялась и была в пределах 8-15 пг/мл.

Добавление ЛПС *in vitro* в концентрации 0,4 мкг/мл в культуру макрофагов перед началом фагоцитоза приводило к индукции синтеза ФНО- $\alpha$ , более выраженной для АМФ (в 2,5 раза выше концентрация по сравнению с контролем). Динамика синтеза ИЛ-1 под действием ЛПС была сходной для фагоцитирующих ПМФ и АМФ, наибольшая концентрация этого цитокина определялась через 1 час контакта с бактериями, что было в 10,4 и 9,4 раза выше контрольных значений соответственно.

При изучении влияния *in vivo* на синтез цитокинов макрофагами ЛПС вводили по 4 мкг белым мышам внутривенно. Макрофаги выделяли на 1, 3 и 5 сутки и моделировали процесс фагоцитоза *in vitro* бактерий *Escherichia coli* Ca 52. Установлено значительное превышение содержания ФНО- $\alpha$  в культуре фагоцитирующих ПМФ и АМФ по сравнению с контрольными показателями. Усиление цитокинсинтезирующей активности отмечено у ПМФ, выделенных на 3 сутки после введения мышам ЛПС. При этом, максимальная концентрация ФНО- $\alpha$  (в 5,8 раз выше по сравнению с контролем) была в 6-ти часовой культуре фагоцитирующих макрофагов. Аналогичная динамика индукции этого цитокина отмечена и для макрофагов, выделенных в другие сроки после введения ЛПС.

Показано увеличение содержания ИЛ-1 в процессе фагоцитоза эшерихий макрофагами, выделенными на 1 и 5 сутки после иммунизации мышей ЛПС. Концентрация этого цитокина в динамике фагоцитоза была выше аналогичных показателей для контрольных макрофагов в 3 - 10 раз соответственно. Максимальное содержание ИЛ-1 во всех экспериментах отмечено на стадии 2-х часового фагоцитоза бактерий АМФ и ПМФ, которое затем уменьшалось к 6 часам.

Таким образом, усиление синтеза цитокинов на фоне действия ЛПС *Azospirillum irakense* КВС1 *in vitro* является доказательством его иммуностимулирующей способности. В то же время повышенная цитокинсинтезирующая активность макрофагов при действии ЛПС *in vivo* может иметь отрицательный эффект, так как одновременная гиперпродукция ИЛ-1 и ФНО- $\alpha$  может привести к развитию эндотоксического шока.