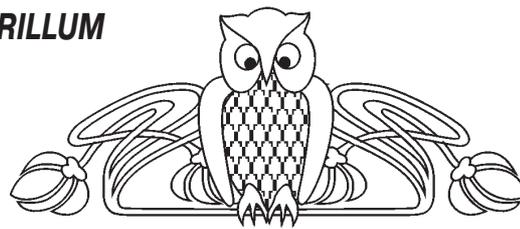




УДК 579.835: 577.114: 612

ГЛИКОПОЛИМЕРЫ БАКТЕРИЙ РОДА *AZOSPIRILLUM* КАК ПЕРСПЕКТИВНЫЕ АНТАГОНИСТЫ КЛАССИЧЕСКИХ ЭНДОДОКСИНОВ

А. К. Суркина¹, С. А. Коннова^{1,2},
Ю. П. Федоненко¹, В. В. Игнатов¹



¹Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН

E-mail: surkina-ak@mail.ru

²Саратовский государственный университет

E-mail: konnova@ibppm.sgu.ru

Проведено сравнительное исследование агонистических и антагонистических свойств, а также токсичности гликополимеров бактерий рода *Azospirillum*. Впервые для азоспирилл показано, что их гликаны обладают антагонистическими свойствами в отношении классических эндотоксинов. Установлено, что существенный вклад в реализацию этой активности вносят отдельные жирные кислоты в составе липидов А. Показано влияние конформации исследованных гликанов на их летальную токсичность и ингибирующее действие в отношении эндотоксина *Escherichia coli* O55:B5. Среди изученных препаратов наивысшую антагонистическую активность проявлял липополисахарид бактерий *A. lipoferum* Sp59b.

Ключевые слова: *Azospirillum*, гликополимер, фактор некроза опухоли альфа, летальная токсичность, антагонизм.

Glycopolymers from Bacteria of the Genus *Azospirillum* as Promising Antagonists of Classic Endotoxins

A. K. Surkina, S. A. Konnova,
Y. P. Fedonenko, V. V. Ignatov

Comparison studies were made on the agonistic and antagonistic properties and on the toxicity of glycopolymers from bacteria of the genus *Azospirillum*. For the first time, it was shown that *Azospirillum* glycans act as antagonists of classic endotoxins. It was observed that certain fatty acids in the lipid A portions of these molecules contributed to the realization of their biological activity. The role of the conformation of the investigated glycans in their lethal toxicity and inhibitory effect on *Escherichia coli* O55:B5 endotoxin was shown. The lipopolysaccharide of *A. lipoferum* Sp59b had the highest antagonistic activity among the investigated polymers.

Key words: *Azospirillum*, glycopolymers, tumor necrosis factor alpha, lethal toxicity, antagonism.

Введение

В настоящее время система врожденного иммунитета рассматривается как первая линия защиты от микробных инфекций, которая быстро реагирует на характерные для патогенов высококонсервативные структуры, патоген-ассоциированные молекулярные паттерны (pathogen-associated molecular patterns – PAMP) [1]. К PAMP относятся липополисахариды (ЛПС) и капсуль-

ные полисахариды (КПС) грамотрицательных бактерий. Данные биополимеры способны запускать механизмы неспецифической защиты макроорганизма, связываясь с толл-подобным рецептором 4 (TLR4), который относится к семейству толл-подобных рецепторов (Toll-like receptors – TLRs) и экспрессируется на клеточной поверхности лейкоцитов [1, 2]. Однако TLR4 не способен вступать в непосредственное взаимодействие с эндотоксином, являясь молекулярной структурой, которая только передает сигнал возбуждения компонентам внутриклеточных сигнальных путей. Взаимодействие бактериальных гликополимеров с мембранными рецепторами моноцитов, макрофагов и нейтрофилов представляет собой сложный многоступенчатый процесс с вовлечением белков-посредников и образованием промежуточных молекулярных комплексов.

ЛПС являются амфипатическими молекулами, которые легко образуют мицеллярные агрегаты. Эти агрегаты очень слабо взаимодействуют с лейкоцитами и поэтому не способны вызвать выраженный клеточный ответ. Транспорт бактериальных гликополимеров от мицеллярных агрегатов к мембранам осуществляется с помощью вырабатываемого в печени белка острой фазы, связывающего ЛПС (LBP – LPS-binding protein). LBP транспортирует ЛПС к секреторному или мембраносвязанному CD14, образуя комплекс ЛПС/CD14, который, в свою очередь, взаимодействует с белком MD-2. Взаимодействие комплекса ЛПС/CD14/MD-2 с эктодоменом TLR4 сопровождается его конформационными изменениями и запускает сигнальный каскад возбуждения. Эта активация приводит к экспрессии сотен генов, в результате чего синтезируется множество цитокинов и хемокинов, включая фактор некроза опухоли альфа (ФНО- α), ответственный за развитие острой воспалительной реакции [3, 4].



Развитие острого воспалительного ответа необходимо для локализации и уничтожения проникших патогенов и запуска механизмов, обеспечивающих активацию и регуляцию факторов специфической защиты макроорганизма. Однако избыточная активация данной реакции может привести к клиническим симптомам септического шока – одной из самых сложных проблем теоретической и практической медицины. Согласно данным мировой статистики, это осложнение по-прежнему является одной из ведущих причин летальности при острой хирургической патологии и гнойно-воспалительных инфекциях человека. Частота встречаемости сепсиса среди стационарных больных составляет 1%, а среди пациентов в различных отделениях реанимации и интенсивной терапии – 20–30%. Число заболеваний, осложненных сепсисом, возросло, а уровень смертности в течение последних 40 лет остался очень высоким: 25–35% для пациентов с сепсисом и 60–80% для пациентов с септическим шоком [5].

Одной из стратегий предотвращения подобных состояний является использование антагонистов эндотоксинов, ограничивающих токсичность или цитокиностимулирующую активность последних. Потенциальными кандидатами на роль антагонистов являются сами ЛПС, которые, прежде всего, нетоксичны или слаботоксичны в отношении макроорганизма, а также не вызывают неконтролируемый синтез лейкоцитами провоспалительных цитокинов. Известно, что ЛПС, обладающие высокой антагонистической активностью по отношению к эндотоксинам, часто встречаются у бактерий, филогенетически удаленных от семейства *Enterobacteriaceae*, основных возбудителей инфекций среди грамотрицательных бактерий. Ранее нами показано, что ЛПС diaзотрофных бактерий рода *Azospirillum* проявляют широкий спектр биологического действия в отношении эукариотических клеток [6]. В работе Komanićska et al. показана низкая эндотоксическая активность ЛПС из *A. lipoferum* SpBr17 [7]. Однако исследования данных гликополимеров как потенциальных антагонистов ЛПС патогенных бактерий до настоящего времени не проводились. Поэтому целью нашей работы было сравнительное изучение токсичности и способности ЛПС азотфиксирующих микроорганизмов рода *Azospirillum* предотвращать вызванную ЛПС *Escherichia coli* O55:B5 (ЛПС_{E. coli}) индукцию синтеза ФНО- α мононуклеарами периферической крови человека.

Материалы и методы

В работе были исследованы ЛПС *A. lipoferum* Sp59b (ЛПС_{Sp59b}), ЛПС *A. irakense* KBC1 (ЛПС_{KBC1}) и КАЗ (ЛПС_{КАЗ}), ЛПБК *A. irakense* KBC1 (ЛПБК_{KBC1}) и его свободное от белка производное (ЛПБК_{KBC1 ПрК}), а также ЛПС_{E. coli} клинического штамма *E. coli* O55:B5 (Sigma). Все препараты использовались в концентрации 1 мкг/мл.

Анализ жирных кислот (ЖК), входящих в состав липида А исследуемых препаратов, проводили методом ГЖХ на хроматографе GC-2010 (Shimadzu, Япония) с капиллярной колонкой HP-5. Метилирование проводили по методу, описанному в работе Mayer [8].

Для избавления от белка к 0,5% раствору препарата ЛПБК_{KBC1} в дистиллированной воде добавляли раствор протеиназы К (Sigma, 15 ед/мг), до конечной концентрации 100 мкг/мл. Реакционную смесь инкубировали 4 ч при 37 °С, 1 ч при 60 °С, затем центрифугировали 30 мин при 5 тыс. об/мин. Супернатант, содержащий ЛПБК_{KBC1 ПрК}, собирали, диализовали против дистиллированной воды в течение суток и лиофильно высушивали.

Размер мицелл ЛПБК_{KBC1} и его модифицированного производного определяли в водном растворе при 25 °С на дзета-сайзере (Malvern, Великобритания).

Острую токсичность определяли экспресс-методом на белых нелинейных мышах, предварительно сенсibilизированных 3,2% D-галактозамингидрохлоридом, при однократном внутривентральном введении гликополимеров. Наблюдение за животными проводили на протяжении 48 ч [9].

Мононуклеары выделяли из периферической крови условно здоровых доноров-добровольцев в градиенте плотности фиккол-урографин (1,077 г/л) стандартным методом [10]. Далее моноциты инкубировали с исследуемыми препаратами в среде 199 с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки в течение 24 ч при 37 °С. Для изучения антагонистических свойств за 2 ч до добавления ЛПС_{E. coli} мононуклеарные клетки стимулировали исследуемыми препаратами. Также осуществляли совместную инкубацию гликополимеров бактерий *Azospirillum* и ЛПС_{E. coli} в соотношении 1:1. ФНО- α определяли в среде культивирования моноцитов с препаратами иммуноферментным методом с тест-системами на основе моноклональных антител производства



ЗАО «Вектор-Бест» (г. Новосибирск). Результаты эксперимента подвергали статистической обработке.

Результаты и их обсуждение

Как было сказано выше, гликополимеры, претендующие на роль антагонистов классических эндотоксинов, прежде всего, должны быть малотоксичными для человека и животных. В связи с этим мы определяли острую токсичность выбранных препаратов ЛПС азоспирилл на белых беспородных мышах (табл. 1).

Таблица 1

Определение острой токсичности исследуемых гликополимеров бактерий рода *Azospirillum*

Препарат	(LD ₅₀), мкг/мышь
ЛПС _{Sp59b}	8,9±1,1*
ЛПС _{КАЗ}	5,5±0,5
ЛПС _{КВС1}	4,5±0,5*
ЛПБК _{КВС1}	148,0±3,0
ЛПБК _{КВС1} ПрК	340,0±11,2

Примечание. * – данные из работы [6].

LD₅₀, рассчитанные для ЛПС_{КВС1}, ЛПС_{КАЗ} и ЛПС_{Sp59b}, были примерно одинаковы (5–9 мкг/мышь), что значительно (около 30 раз) превышало LD₅₀ ЛПС_{E. coli} (0.14 мкг/мышь).

Известно, что многие грамотрицательные микроорганизмы способны образовывать вокруг клеточной оболочки капсулу, в состав которой входят капсульные полисахариды, или синте-

зировать внеклеточные полисахариды – экзогликаны, играющие важную роль в инициации иммунологического ответа макроорганизма. Так, благодаря высокому отрицательному заряду, обусловленному КПС, энтеропатогенные бактерии обладают мощным разрушающим действием на комплимент и фагоциты. Кроме того, действие данных биополимеров усиливается энтеротоксинами белковой природы [11]. Ранее нами выделен и охарактеризован по химическому составу ЛПБК из капсульного материала *A. irakense* КВС1. Выяснено, что ЛПБК в капсуле является экстраклеточной формой ЛПС, и изолированный из него полисахарид идентичен О-специфическому полисахариду (ОПС) из ЛПС_{КВС1} и построен из разветвленных гексасахаридных повторяющихся звеньев, содержащих остатки D-галактозы, L-рамнозы и D-маннозы [12]. С целью установления вклада белковой составляющей в реализацию иммуностимулирующей активности гликополимера капсулы азоспирилл ЛПБК_{КВС1} обрабатывали протеиназой К, после чего оценивали его иммуномодулирующий эффект.

Установлено, что ЛПБК_{КВС1} был приблизительно в 33 раза менее токсичен (148 мкг/мышь) по сравнению с ЛПС_{КВС1}. Протеиназная обработка гликополимера капсулы привела к еще большему снижению токсичности относительно ЛПС того же штамма (340 мкг/мл).

Показано, что цитокининдуцирующая активность ЛПС_{КВС1} абсолютно идентична таковой ЛПБК_{КВС1} (рис. 1). Концентрация ФНО-α в

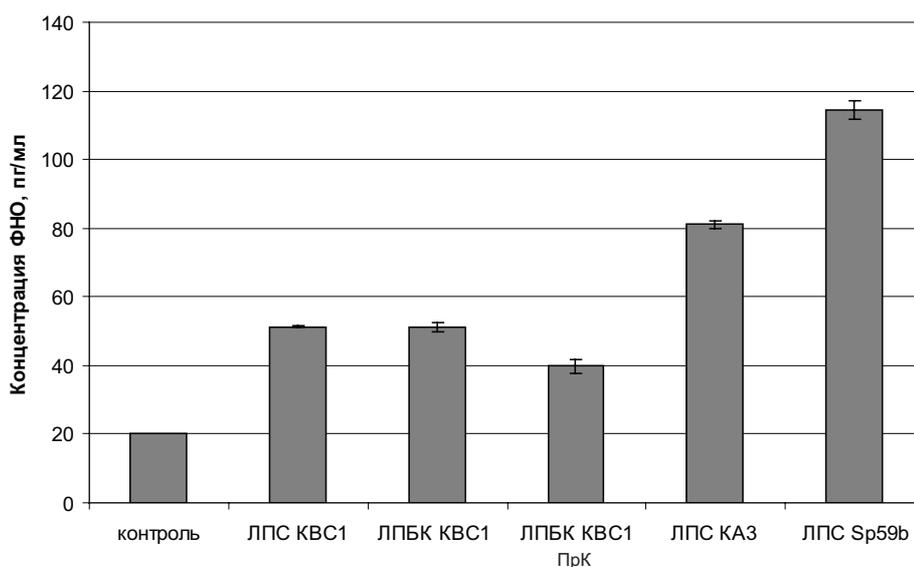


Рис. 1. Синтез ФНО-α человеческими мононуклеарами при добавлении исследуемых препаратов



среде инкубирования при добавлении данных препаратов достигала 51 пг/мл. Стимулирующий эффект ЛПБК_{КВС1} прк был слабее, к 24 ч содержание цитокина в супернатантах составило 40 пг/мл, что в 2 раза выше по сравнению с контролем (20 пг/мл). ЛПС_{КАЗ} индуцировал синтез ФНО- α мононуклеарами человека до 80 пг/мл. Среди исследованных гликополимеров азоспирилл наибольшим стимулирующим эффектом обладал ЛПС_{Sp59b} (115 пг/мл). Тем не менее, его цитокин-индуцирующая активность была ниже почти в 3 раза в сравнении с действием ЛПС_{E. coli} (300 пг/мл).

Согласно литературным данным, проявляемая эндотоксином биологическая активность зависит от особенностей его структуры и, прежде всего, от строения липидной составляющей данной молекулы [13]. В связи с этим нами был проведен анализ профилей ЖК исследуемых гликанов.

Методом ГЖХ после метанолиза в составе липидов А ЛПС и ЛПБК были идентифицированы предельные, непредельные алкановые и гидроксилалкановые кислоты с длиной цепи от C₁₂ до C₁₈ (табл. 2). Установлено, что состав и соотношение ЖК в гликополимерах *A. irakense* были практически идентичны, за исключением отсутствия в ЛПС_{КВС1} гексадекановой кислоты и наличия в ЛПБК_{КВС1} 2-гидрокситетрадекановой (8%) и октадеценновой (11%) кислот. Во всех исследованных препаратах штаммов *A. irakense* доминирующими по содержанию были додекановая (9–12%), 3-гидрокситетрадекановая (43–61%) и 3-гидроксигексадекановая (13–24%)

кислоты. Профиль ЖК ЛПС_{Sp59b} отличался как по качественному, так и по количественному содержанию от состава ЖК вышеуказанных препаратов. В липиде А ЛПС_{Sp59b} преобладающими были додекановая (21%) и 3-гидроксидодекановая (31%) кислоты. Также в данном гликане приблизительно в равном количестве (8–13%) идентифицированы 2-гидроксидодекановая, 3-гидрокситетрадекановая, гексадекановая и октадеценновая жирные кислоты. Показанные вариации в структуре липидной компоненты исследуемых препаратов сделали их удобной моделью для изучения их структурно-функциональных свойств и установления вклада отдельных ЖК в реализацию гликополимерами азоспирилла биологической активности.

Известно, что для липида А классического эндотоксина ЛПС *E. coli* характерны жирные кислоты с 14 и 12 углеродными атомами, при этом преобладающей по содержанию является 3-ОН-С_{14:0}. Любое отклонение в сторону увеличения или уменьшения длины цепей ЖК, а также степени ацилирования липидного домена ЛПС приводит к значительному изменению его эндотоксической активности [13]. В гликополимерах штамма *A. irakense*, как и в ЛПС *E. coli*, обнаружена С_{12:0}, а преобладающей по содержанию является 3-ОН-С_{14:0}. Однако присутствие в ЛПС_{КВС1}, ЛПС_{КАЗ} и ЛПБК_{КАЗ} жирных кислот с 16 и 18 углеродными атомами, вероятно, стало причиной снижения токсичности и цитокин-индуцирующей активности по сравнению с ЛПС_{E. coli}.

Таблица 2

Соотношение жирных кислот в исследуемых препаратах гликополимеров бактерий рода *Azospirillum*

Жирные кислоты	Содержание МЭЖК, % от суммы площадей всех пиков			
	ЛПС _{Sp59b} *	ЛПС _{КАЗ}	ЛПС _{КВС1}	ЛПБК _{КВС1}
Додекановая (C _{12:0})	21,5±3,4	11,7±2,9	10,2±1,7	9,0±1,3
2-Гидроксидодекановая (2-ОН-С _{12:0})	11,1±1,2	–	–	–
3-Гидроксидодекановая (3-ОН-С _{12:0})	31,9±0,7	–	–	–
2-Гидрокситетрадекановая (2-ОН-С _{14:0})	–	–	–	8,1±0,1
3-Гидрокситетрадекановая (3-ОН-С _{14:0})	11,5±2,5	68,9±2,0	61,4±2,4	42,5±0,3
Гексадекановая (C _{16:0})	12,8±0,4	6,9±0,9	–	5,6±0,2
3-Гидроксигексадекановая (3-ОН-С _{16:0})	–	12,6±2,2	28,5±2,0	23,7±0,1
Октадеценновая (C _{18:1})	8,4±2,2	–	–	11,2±0,9

Примечание. «–» – ЖК отсутствовали; * – данные из работы [14].



Гликополимеры исследованных штаммов *A. irakense* характеризовались наличием идентичных ОПС и незначительными отличиями в составе и соотношении ЖК их липидов А. ЛПС_{КВС1} и ЛПС_{КАЗ} реализовывали одинаковую токсичность в отношении теплокровных животных, однако ЛПС_{КАЗ} в 1,6 раза сильнее индуцировал синтез ФНО- α человеческими мононуклеарами. Данный результат свидетельствует о том, что присутствие в липиде А С_{16:0} не оказывает влияние на токсичность, но, возможно, вносит вклад в агонистические свойства данного гликополимера. Рассчитанная для ЛПБК_{КВС1} LD₅₀ была намного выше, по сравнению с LD₅₀, установленными для ЛПС *A. irakense*. Удаление белковой составляющей из ЛПБК_{КВС1} не приводило к восстановлению токсичных свойств до уровня ЛПС_{КВС1} и ЛПС_{КАЗ}, но в то же время не оказывало существенного влияния на цитокиностимулирующую активность производного, по сравнению с ЛПС того же штамма. Данный факт позволил выдвинуть предложение, что идентифицируемые в ЛПБК_{КВС1} 2-ОН-С_{14:0} и С_{18:1}, вероятнее всего, определяют крайне низкую токсичность данного гликана, но не вносят существенных изменений в его цитокиностимулирующие свойства.

Неожиданным оказался факт снижения токсичности после обработки исследуемого ЛПБК протеиназой К. Возможно, что наблюдаемый эффект связан с изменением после протеиназной обработки специфической конформации молекулы ЛПБК и, как следствие, с интенсификацией мицеллообразования, затрудняющего взаимодействие ЛПБК_{КВС1} прк с рецепторами клеточной поверхности моноцитов. Для подтверждения данной теории был проведен эксперимент по определению размера мицелл ЛПБК и его модифицированного производного. Полученные результаты свидетельствуют об уменьшении среднего диаметра мицелл с 104 до 79 нм и снижении гетерогенности частиц по размеру после модификации. Данный факт подтверждает наличие изменений в конформации молекулы ЛПБК, что, возможно, послужило причиной снижения токсичности препарата (увеличения в 2 раза LD₅₀).

Различное влияние протеиназной обработки на биологическую активность ЛПБК_{КВС1} *in vivo* и *in vitro* можно объяснить тем, что ЛПС [6] и ЛПБК *A. irakense* КВС1 являются активными индукторами синтеза оксида азота в спленocyтах мышей. Установлено, что удаление белковой

компоненты из ЛПБК_{КВС1} приводило к снижению продукции NO в 2 раза по сравнению с нативным препаратом [12]. Значительная стимуляция синтеза NO может отражать развитие токсигенной реакции макроорганизма на эндотоксин, что может служить объяснением наблюдаемой корреляции между результатами по индукции NO и значениями LD₅₀ для ЛПБК_{КВС1} и ЛПБК_{КВС1} прк.

Сравнительное изучение способности стимулировать продукцию ФНО- α мононуклеарными клетками препарата ЛПС_{Sp59b} показало, что он является более сильным индуктором по сравнению с гликополимерами бактерий *A. irakense*. Полученный результат был предсказуем, учитывая кардинальные отличия в профилях ЖК указанных гликанов. Кроме того, для ЛПС и ЛПБК представителей *A. irakense* было отмечено низкое содержание фосфора (0,3–0,5%) в отличие от ЛПС_{Sp59b}, содержание фосфора в котором достигает почти 3%. Согласно данным литературы, эндотоксическая активность зависит не только от состава и соотношения ЖК, но и от степени фосфорилирования ЛПС. Так, замена двух фосфатных групп на остатки галактозамина в липиде А *Aquifex pyrophilus* предположительно является одним из структурных факторов, определяющих низкую способность ЛПС этой бактерии активировать моноциты человека [15]. Химическая модификация ЛПС с помощью дефосфорилирования плавиковой кислотой также приводит к существенному снижению его биологической активности [16].

Полученные результаты свидетельствовали о слабой токсичности и умеренной провоспалительной активности гликополимеров бактерий рода *Azospirillum*, что явилось предпосылкой для исследования антагонистических свойств данных препаратов.

Преинкубация мононуклеарных клеток с исследуемыми гликанами значительно снижала стимулируемую классическим эндотоксином продукцию ФНО- α (рис. 2). Следует отметить, что цитокинигибирующая активность ЛПС_{КАЗ}, ЛПС_{КВС1} и ЛПБК_{КВС1} прк была примерно на одном уровне (~60 пг/мл), а наибольшим ингибирующим эффектом обладали ЛПС_{Sp59b} и ЛПБК_{КВС1} (40 и 45 пг/мл соответственно). Ранее при исследовании динамики синтеза ФНО- α в процессе фагоцитоза *E.coli* Ca 53 нами показано, что содержание цитокина в культуральной среде в присутствии ЛПС некоторых штаммов



азоспирилл (в том числе и ЛПС_{КВС1}) возрастает уже к 2 ч инкубации. А ЛПС, выделенный из *A. brasilense* Sp245, в концентрации 1 мкг/мл стимулировал синтез цитокина мононуклеарами периферической крови человека до 65 пг/мл уже к 1 ч процесса фагоцитоза [17]. Данный факт в совокупности с результатами эксперимента свидетельствуют о том, что гликаны бактерий рода *Azospirillum* способны в короткие сроки эффективно связываться с рецепторами клеточ-

ной поверхности мононуклеаров, что, в свою очередь, препятствует взаимодействию ЛПС_{E. coli} с клетками-мишенями и чрезмерной продукции ФНО- α . Однако простая маскировка рецепторного аппарата от эндотоксина-индуктора не является основным механизмом антагонистической активности биогликанов азоспирилл, что подтверждается в эксперименте по одновременной стимуляции исследуемых препаратов и ЛПС_{E. coli} в соотношении 1:1 в культуре моноцитов.

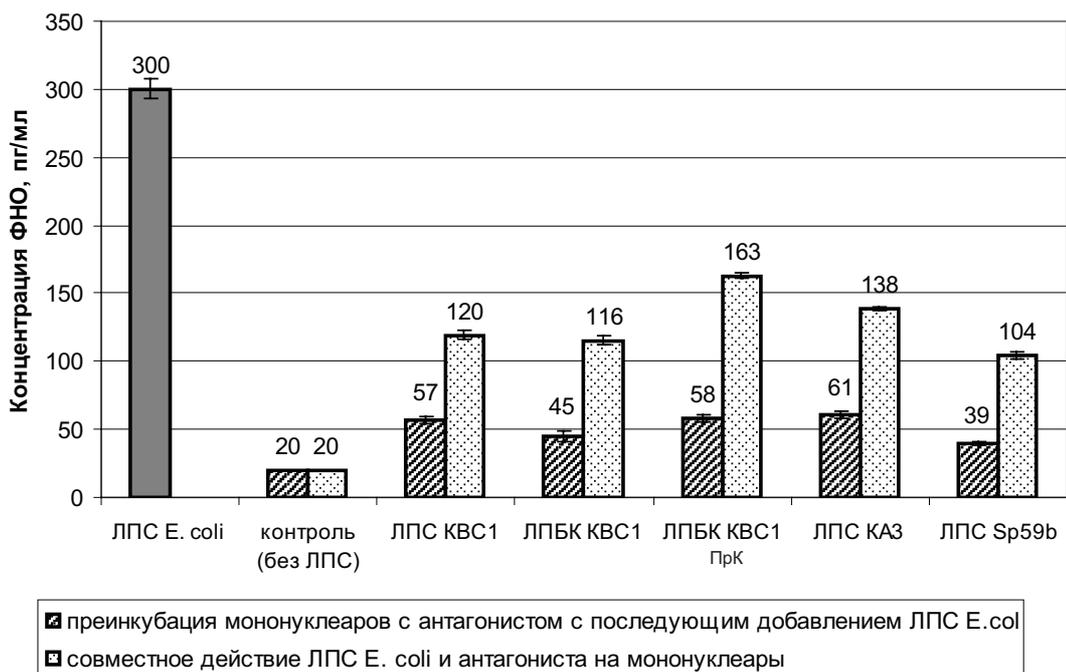


Рис. 2. Цитокинингибирующая активность гликополимеров бактерий рода *Azospirillum* в отношении ЛПС *E. coli* O55:B5

Установлено, что гликополимеры азоспирилл при совместной инкубации с ЛПС_{E. coli} в среде культивирования мононуклеаров проявляли антагонистические свойства в отношении данного эндотоксина. При этом ЛПС_{КВС1} и ЛПБК_{КВС1}, как и в эксперименте по стимуляции синтеза ФНО- α , обладали идентичной активностью, а ингибирующий потенциал ЛПС_{КА3} был несколько ниже данных препаратов, что также коррелирует с его более высокой агонистической активностью. Способность подавлять индуцированную ЛПС_{E. coli} продукцию цитокина при совместной инкубации увеличивалась в ряду ЛПБК_{КВС1} ПрК → ЛПС_{КА3} → ЛПС_{КВС1}, ЛПБК_{КВС1} → ЛПС_{Sp59b}. Наиболее слабым ингибитором ЛПС_{E. coli} оказался ЛПБК_{КВС1} ПрК, хотя в эксперименте по преинкубации он оказался одним из сильнейших антагонистов, что, однако,

можно объяснить его низкой цитокининдуцирующей способностью. При сохранении способности взаимодействовать с моноцитами и синтезировать ФНО- α данный гликополимер значительно уступает остальным препаратам в конкурирующих свойствах за рецепторный аппарат мононуклеаров периферической крови человека. Низкая активность ЛПБК_{КВС1} ПрК при совместной инкубации с индуктором может быть обусловлена «сбоем» на любом этапе его взаимодействия с рецепторами макроорганизма, начиная с первого звена – ЛВР.

Несмотря на наивысшую среди исследованных препаратов степень индукции синтеза цитокина, ЛПС_{Sp59b} показал самую высокую антагонистическую активность как в эксперименте по преинкубации, так и при совместной инкубации с ЛПС_{E. coli}. Полученный результат не вызывает удивления, учитывая кардинальные



отличия в химической структуре и прежде всего в жирнокислотном составе липидной компоненты ЛПС_{Sp59b} и гликанов представителей *A. irakense*. Из данных литературы известно, что липиды А, проявляющие высокий антагонизм по отношению к эндотоксинам, имеют низкую степень фосфорилирования и ацилирования [18]. Однако ЛПС_{Sp59b} характеризовался относительно высоким содержанием фосфора, в связи с чем проявляемый антагонизм можно объяснить его ЖК профилем. В работе Brandenburg et al. показано, что липид А *Rhodobacter capsulatus*, содержащий более короткие по сравнению с *E. coli* ЖК, включая одну непредельную карбоновую кислоту, проявляет антагонистические свойства [14]. В липиде А ЛПС_{Sp59b} идентифицирована одна ненасыщенная кислота, а на долю ЖК с числом углеродных атомов меньше 14 в гидрофобном домене молекулы приходится ~65%. Возможно, подобное строение послужило структурным базисом для проявления гликополимером характерных для него активностей. Интересен тот факт, что концентрация ФНО- α в среде культивирования моноцитов при стимуляции ЛПС_{Sp59b} за 2 ч до внесения ЛПС_{E. coli} была в 3 раза ниже по сравнению с результатом, полученным при одностороннем инкубировании ЛПС_{Sp59b} с мононуклеарными клетками. Вероятно, присутствие ЛПС_{Sp59b} и ЛПС_{E. coli} в равном соотношении способствует образованию в реакционной среде смешанных мицелл. Благодаря этому снижается доступность для LBP и скорость доставки к рецепторному аппарату клеток-мишеней макроорганизма, в результате чего снижается цитокининдуцирующая активность обоих препаратов. Данный факт, возможно, указывает на то, что ЛПС_{Sp59b} осуществляет свою ингибирующую активность в отношении ЛПС_{E. coli} не только по механизму конкурентного, но и неспецифического ингибирования. Изложенное свидетельствует о том, что на современном этапе изучения отличительных особенностей ЛПС бактерий предпочтение следует отдать методам установления их свойств, которые могут определяться не только химической структурой, но и конформацией молекулы.

Проведенное исследование гликанов представителей *A. irakense* позволяет сделать вывод о том, что незначительные вариации в их липидах А не оказывают существенного влияния на проявление данными биополимерами антагонистической активности. Тем не менее, изменения в конформации молекулы могут привести к значительному снижению ее ингибирующих

свойств, что показано на примере ЛПБК_{КВС1} и его модифицированного производного. Наблюдаемая биологическая активность гликанов азоспирилл в отношении ЛПС_{E. coli}, вероятно, осуществляется по механизму конкурентного ингибирования. Как было сказано выше, активация моноцитов липополисахаридами – это сложный многоступенчатый процесс с образованием промежуточных комплексов и вовлечением множества молекул-посредников. Ингибирование классического эндотоксина гликанами-антагонистами может осуществляться на основных этапах распознавания ЛПС клеткой-мишенью: 1) на этапе взаимодействия ЛПС с LBP; 2) при связывании с молекулой CD14; 3) и, наконец, при образовании рецепторного комплекса, способного к проведению сигнала. На каком из этапов реализуется антагонистическая активность исследуемых препаратов, предстоит выяснить в дальнейших исследованиях.

Полученные в ходе выполнения данной работы результаты свидетельствуют об умеренной иммуномодулирующей активности гликополимеров ризобактерий. Изученные биополимеры безопасны для человека и животных и являются потенциальными антагонистами ЛПС_{E. coli}, что может быть применено в медицинской практике для создания на их основе препаратов коррекции иммунного ответа макроорганизма. Наиболее перспективным в данном плане является ЛПС_{Sp59b}, показавший низкую токсичность в эксперименте с лабораторными животными и наибольшую ингибирующую активность в отношении классического эндотоксина *E. coli* O55:B5.

Работа выполнена при поддержке РФФИ (грант 11-04-00533а).

Список литературы

1. Janeway C., Jr., Medzhitov R. Innate immune recognition // Annu. Rev. Immunol. 2002. Vol. 20. P. 197–216.
2. Moresco E., LaVine D., Beutler B. Toll-like receptors // Curr. Biol. 2011. Vol. 21, № 13. P. 488–493.
3. Heumann D., Roger T. Initial responses to endotoxins and Gram-negative bacteria // Clin. Chim. Acta. 2002. Vol. 323. P. 59–72.
4. Alexander C., Rietschel E. Bacterial lipopolysaccharides and innate immunity // J. Endotoxin. 2001. Vol. 7, № 3. P. 167–202.
5. Llewelyn M., Cohen J. Tracking the microbes in sepsis: advancements in treatment bring challenges for microbial epidemiology // Clin. Infect. Dis. 2007. Vol. 44, № 10. P. 1343–1348.
6. Фомина А. А., Петров А. В., Коннова С. А., Бойко А. С., Федоненко Ю. П., Тихомирова Е. И., Симбирцев А. С. Особенности строения и биологические



- свойства липополисахаридов азоспирилл в отношении активации факторов неспецифической резистентности макроорганизма // Цитокины и воспаление. 2009. Т. 8, № 4. С. 23–27.
7. *Komaniecka I., Zdzisinska B., Kandefers-Szerszen M., Choma A.* Low endotoxic activity of lipopolysaccharides isolated from *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, and *Azospirillum* strains // *Microbiol. Immunol.* 2010. Vol. 54. P. 717–725.
 8. *Mayer H., Tharanathan R., Weckesser J.* Analysis of lipopolysaccharides of gram-negative bacteria // *Meth. Microbiol.* 1985. Vol. 18. P. 157–207.
 9. *Прозоровский В. Б., Прозоровская М. П., Демченко В. М.* Экспресс-метод определения средней эффективной дозы и ее ошибки // *Фармакология и токсикология.* 1978. № 4. С. 497–502.
 10. Иммунология. Практикум : учеб. пособие / под ред. Л. В. Ковальчука, Г. А. Игнатъевой, Л. В. Ганковской. М. : ГЭОТАР-Медиа, 2010. 176 с.
 11. *Оводов Ю. С.* К-антигены бактерий. Строение К-антигенов бактерий (обзор) // *Биохимия.* 2006. Т. 71, № 9. С. 1155–1174.
 12. *Fedonenko Y. P., Burygin G. L., Popova I. A., Sigida E. N., Surkina A. K., Zdorovenko E. L., Konnova S. A.* Immunochemical Characterization of the Capsular Polysaccharide of *Azospirillum irakense* KBC1 // *Curr. Microbiol.* 2013. doi: 10.1007/s00284-013-0346-1.
 13. *Rietschel E., Kirikae T., Schade F., Mamat U., Schmidt G., Loppnow H., Ulmer A., Zähringer U., Seydel U., Di Padova F., Schreier M., Brade H.* Bacterial endotoxin: molecular relationships of structure to activity and function // *FASEB J.* 1994. Vol. 8. P. 217–225.
 14. *Смолякина О. Н., Качала В. В., Федоненко Ю. П., Бурьгин Г. Л., Здоровенко Э. Л., Матора Л. Ю., Коннова С. А., Игнатов В. В.* Капсульный полисахарид бактерии *Azospirillum lipoferum* Sp59b. Структура и антигенная специфичность // *Биохимия.* 2010. Т. 75, № 5. С. 707–716.
 15. *Кабанов Д. С., Прохоренко И. Р.* Связь между физико-химическими характеристиками и биологической активностью липополисахаридов // *Биологические мембраны.* 2011. Т. 28, № 5. С. 323–338.
 16. *Brandenburg K., Andrä J., Müller M., Koch M. H., Garidel P.* Physicochemical properties of bacterial glycopolymers in relation to bioactivity // *Carbohydr. Res.* 2003. Vol. 338, № 23. P. 2477–2489.
 17. *Фомина А. А.* Влияние бактериальных гликополимеров на функционально-метаболический статус лейкоцитов и активность ключевых ферментов метаболизма мышей : дис. ... канд. биол. наук. Саратов, 2010. 149 с.
 18. *Воробьева Е. В., Красикова И. Н., Соловьева Т. Ф.* Влияние липополисахаридов и липидов А из некоторых морских бактерий на индукцию спонтанного и индуцированного липополисахаридом из *Escherichia coli* синтеза ФНО- α клетками периферической крови человека // *Биохимия.* 2006. Т. 71, № 7. С. 936–944.

УДК 581.9 (470.44)

ВИДОВОЙ СОСТАВ РОДА *SALIX* L. НА АНТРОПОГЕННЫХ МЕСТООБИТАНИЯХ САРАТОВСКОЙ ОБЛАСТИ

Е. В. Угольников, М. А. Березуцкий, А. С. Кашин

УНЦ «Ботанический сад» СГУ, Саратов
E-mail: cat.ugolnikova@yandex.ru

Приводятся данные о видовом составе р. *Salix* L. на антропогенных местообитаниях Саратовской области.

Ключевые слова: антропогенные местообитания, *Salix*.

Species Composition of *Salix* L. on Anthropogenic Habitats of Saratov Region

E. V. Ugolnikova, M. A. Berezutsky, A. S. Kashin

The information about species composition of *Salix* L. in anthropogenic habitats of Saratov region is given.

Key words: the anthropogenic habitats, *Salix*.

В последние столетия территория Саратовской области подвергалась интенсивному и многофакторному антропогенному воздействию. Одним из важнейших проявлений этого воздействия явля-

ется резкое увеличение площади антропогенных биотопов. К настоящему времени площадь антропогенных биотопов на территории Саратовской области превышает площадь естественных. Только под землями прямого сельскохозяйственного назначения находится 85% её площади. В этих условиях на первый план выходит задача выяснения степени толерантности того или иного вида растений региона к антропогенному воздействию и способности его произрастать на антропогенных местообитаниях. На территории Саратовской области уже начата работа по выявлению степени антропотолерантности отдельных таксонов [1, 2]. Однако в отношении подавляющей части таксонов растений региона такие исследования еще не проведены.

