



УДК 577.15.579.62

ВЛИЯНИЕ ЛИПОПОЛИСАХАРИДОВ РАЗЛИЧНЫХ ИЗОЛЯТОВ *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* НА ПЕЧЕНЬ И ПЕРИТОНЕАЛЬНЫЕ КЛЕТКИ БЕЛЫХ КРЫС

К. П. Габалов, Т. Н. Тарасенко, М. Л. Малинин, Л. Б. Обух, О. А. Василенко,
В. Н. Ласкавый, С. А. Староверов, Г. В. Мельников¹



ГНУ Саратовский НИВИ Россельхозакадемии

E-mail: nivs@sun.ru

¹Саратовский государственный университет

E-mail: biofac@sgu.ru

Изучено выделение трансаминаз клетками печени крысы под влиянием ЛПС различных изолятов *P. aeruginosa*, под влиянием активированных липополисахаридами перитонеальных клеток, и их культуральных жидкостей. Показана зависимость активности АСТ и АЛТ в экстракте печеночного гомогената от наличия в среде перитонеальных клеток и от их дыхательной активности. Показана зависимость изменения дыхательной активности перитонеальных макрофагов под влиянием ЛПС от вирулентности изолятов *P. aeruginosa*.

Ключевые слова: *Pseudomonas*, липополисахарид, макрофаг, НСТ-тест.

Effect of Lipopolysaccharide of Different Strains *Pseudomonas aeruginosa* for the Liver and Peritoneal Cells of Albino Rats

K. P. Gabalov, T. N. Tarasenco, M. L. Malinin,
L. B. Obuh, O. A. Vasilenco, V. N. Laskaviy,
S. A. Staroverov, G. V. Melnikov

Was studied the allocation of transaminases by the rat liver cells under the influence of LPS of different isolates of *P. aeruginosa*, under the influence of LPS-activated peritoneal cells and their culture fluids. Shown the dependence of AST and ALT activities in the liver homogenate extract from the presence in the medium of peritoneal cells and their respiratory activity. Also shown the dependence of changes in the respiratory activity of peritoneal macrophages under the influence of LPS from the virulence of *P. aeruginosa* isolates.

Key words: *Pseudomonas*, lipopolysaccharide, macrophage, NBT-test.

Синегнойная палочка *Pseudomonas aeruginosa* – возбудитель инфекционных заболеваний, характеризуется высокой природной устойчивостью к большинству антимикробных препаратов и хорошей переживаемостью в окружающей среде [1]. *P. aeruginosa*, относящаяся к грамотрицательным неферментирующим микроорганизмам, является одним из наиболее частых возбудителей нозокомиальных инфекций [2]. Для инфекций, вызванных синегнойной палочкой, характерны тяжелое течение и высокая летальность, достигающая 39% [3, 4].

Характерной особенностью синегнойной палочки является то, что она практически никогда

не поражает здоровые ткани. С другой стороны, нет таких тканей, которые в случае снижения их защитных функций не могли бы подвергнуться атаке со стороны данного микроорганизма [5]. При повышенной влажности кормов возможно развитие псевдомоноза как кормовой токсикоинфекции. Из-за способности синегнойной палочки накапливаться в окружающей среде заболеванию подвержен не только молодняк, но и животные предубойного возраста [6].

Ведущую роль в развитии инфекций, вызванных грамотрицательными микроорганизмами, играет липополисахарид, являющийся основным соматическим антигеном этих бактерий.

Целью настоящей работы было изучение влияния липополисахаридов (ЛПС) различных изолятов *P. aeruginosa* на перитонеальные клетки, а также клетки печени крысы.

Материалы и методы

В работе использовались перитонеальные клетки (ПК) белых крыс. ПК ресуспендировались в среде DMEM до $5.7 \cdot 10^6$ кл/мл с добавлением нитросинего тетразолия до конечной концентрации 0.01%. К аликвотам суспензии ПК объемом по 0,9 мл были добавлены растворы ЛПС (по 0.1 мл) изолятов *P. aeruginosa* 4, 8 (вирулентные), 11, 12, 14 (авирулентные). ЛПС выделялись методом водно-фенольной экстракции по Вестфалу [7]. Финальные концентрации ЛПС в суспензии клеток составляли 4 мкг/мл по полисахариду; в качестве контроля использовался физиологический раствор вместо ЛПС.

Суспензии, содержащие ПК и ЛПС (ПК ЛПС), инкубировали в течение 2 ч при 37 °С. По окончании времени инкубации каждую пробу делили на две равные части. В первых аликвотах определяли накопление формазана клетками в НСТ-тесте [8]. Вторые аликвоты центрифугировали, отбирали по 500 мкл супернатантов (культуральные жидкости, КЖ ПК), а также осадки клеток; клетки ресуспендировали в



500 мкл среды DMEM. К супернатантам и суспензиям клеток добавляли по 500 мкл суспензии гомогената печени белой крысы в среде RPMI, полученного с помощью тканевой мельницы. К третьему ряду аликвот суспензии печеночного гомогената добавляли растворы ЛПС указанных изолятов до финальной концентрации 4 мкг/мл по полисахариду. Все три ряда проб инкубировали в течение 30 мин при 37 °С, центрифугировали (3000 g, 10 мин), определяли активность трансаминаз АСТ и АЛТ кинетическими методами без использования 5-фосфопиридоксала [9]. Данная схема эксперимента обеспечивала выраженное взаимодействие перитонеальных клеток, клеток печени и растворимых антигенов.

Результаты и их обсуждение

Дыхательная активность ПК при добавлении ЛПС как вирулентных (29.2 ± 0.3 нг формазана

на 10^6 клеток), так и авирулентных (23.9 ± 0.2 нг формазана на 10^6 клеток) изолятов была выше, чем в контроле (22.4 ± 0.2 нг формазана на 10^6 клеток), на 30.4% и 6.7% соответственно.

Таким образом, ЛПС всех изучавшихся изолятов *P. aeruginosa* в низкой концентрации оказывает стимулирующее действие на дыхание перитонеальных клеток крысы. При этом интенсивность влияния ЛПС зависит от вирулентности – у вирулентных изолятов она заметно выше.

При биохимическом исследовании было установлено, что активность АЛТ в экстракте печеночного гомогената, полученного под влиянием гомологичных перитонеальных клеток, обработанных ЛПС, снижается, причем для ЛПС вирулентных изолятов это снижение несколько более выражено, чем для авирулентных. Впрочем, в обоих случаях снижение АЛТ незначительно и составляет 14–17% (таблица).

Влияние перитонеальных клеток на выделение печенью трансаминаз

Параметры	Контроль			Вирулентные изоляты			Авирулентные изоляты		
	ПК+ЛПС	КЖ ПК	ЛПС	ПК+ЛПС	КЖ ПК	ЛПС	ПК+ЛПС	КЖ ПК	ЛПС
АЛТ, мкмоль/мин·л	275.85 ± 25.1	116.91 ± 10.8	274.05 ± 26.2	229.75 ± 22.0	61.20 ± 5.7	124.40 ± 11.5	236.37 ± 20.7	208.87 ± 19.4	245.30 ± 22.9
АСТ, мкмоль/мин·л	175.7 ± 16.1	200.7 ± 20.0	75.2 ± 6.9	44.80 ± 3.8	203.95 ± 18.6	80.40 ± 7.1	168.50 ± 15.7	231.03 ± 21.8	114.43 ± 10.0
Коэффициент де Ритис	0.64 ± 0.04	1.72 ± 0.1	0.27 ± 0.1	0.19 ± 0.1	3.34 ± 0.2	0.68 ± 0.1	0.72 ± 0.1	1.13 ± 0.1	0.46 ± 0.04

Активность АСТ в случае ЛПС вирулентных изолятов падает на 74%, а в случае ЛПС авирулентных изолятов остается практически неизменной.

Коэффициент де Ритис, отражающий отношение АСТ/АЛТ, для ЛПС вирулентных изолятов снижается на 70%, а для ЛПС авирулентных изолятов – повышается на 14%.

Полученные данные позволяют говорить о том, что ЛПС, в зависимости от вирулентности изолята, по-разному влияет на ПК и клетки печени крысы. В перитонеальных клетках под влиянием ЛПС повышается дыхательная активность. Трансаминазный профиль ферментов, выделенных печеночными дольками в среду в присутствии ПК, обработанных ЛПС, различен в зависимости от вирулентности изолятов. В случае использования ЛПС авирулентных изолятов *P. aeruginosa* отличия от контроля незначительны. В то же время при использовании ЛПС вирулентных изолятов *P. aeruginosa* коэффициент де Ритис снижается по сравнению с контролем в 3.4 раза, активность АСТ – в 3.9 раза, активность АЛТ – в 1.2 раза. Резкое снижение коэффициента де Ритис происходит за счет существенного уменьшения активности АСТ.

Таким образом, реакция перитонеальных макрофагов на добавление к среде ЛПС различных изолятов синегнойной палочки коррелирует с вирулентностью последних. Клетки печени также отвечают адекватно (понижается коэффициент де Ритис в присутствии уже активированных макрофагов). При добавлении ЛПС авирулентных изолятов дыхательная активность ПК незначительно возрастает. В присутствии активированных макрофагов несколько увеличивается коэффициент де Ритис экстракта печеночного гомогената, причем за счет снижения АЛТ.

При проведении корреляционного анализа с вычислением коэффициента Пирсона была выявлена значительная обратная корреляция (-0.64) между интенсивностью дыхания ПК и активностью АСТ в экстракте печеночного гомогената под влиянием тех же ПК. При этом корреляция между интенсивностью дыхания перитонеальных клеток и значениями коэффициента де Ритис составила -0.60 , а между интенсивностью дыхания ПК и активностью АЛТ составила -0.18 . Таким образом, добавление к печеночному гомогенату ПК, уже активированных с помощью ЛПС вирулентных изолятов *P. aeruginosa*, демонстрирую-



щих высокую интенсивность дыхания, приводит к существенному снижению коэффициента де Ритис в экстракте печеночного гомогената, причем преимущественно за счет уменьшения активности АСТ. Напротив, добавление суспензии ПК с ЛПС авирулентных изолятов не оказывало существенного влияния на трансаминазный профиль экстракта печеночного гомогената.

Нами изучалось также влияние культуральной жидкости перитонеальных клеток (КЖ ПК), подвергшихся обработке ЛПС, на трансаминазный профиль экстракта печеночного гомогената. Было установлено, что влияние КЖ ПК значительно отличается от влияния суспензии тех же ПК. Так, при добавлении культуральной жидкости активность АЛТ ниже, а активность АСТ выше по сравнению с добавлением суспензии ПК. Коэффициент де Ритис при добавлении суспензии ПК всегда меньше единицы, а при добавлении КЖ ПК во всех случаях становится больше единицы. В контроле (культуральная жидкость перитонеальных клеток, не подвергавшихся обработке ЛПС) коэффициент де Ритис увеличивается в 2.7 раза, при добавлении ЛПС авирулентных изолятов – в 1.6 раза, а при добавлении ЛПС вирулентных изолятов – в 17.6 раза по сравнению с суспензией ПК.

При добавлении растворов ЛПС *P. aeruginosa* к гомогенизированной печени без участия ПК в экстракте печеночного гомогената снижалась активность АЛТ, причем более выражено в случае ЛПС вирулентных изолятов. Активность АСТ, напротив, повышалась, причем более выражено в случае ЛПС авирулентных изолятов. Коэффициент де Ритис в экстракте печеночного гомогената повышался при добавлении ЛПС вирулентных изолятов в 2.5 раза, а при добавлении авирулентных изолятов – в 1.7 раза.

Итак, при добавлении к печеночному гомогенату перитонеальных клеток, обработанных ЛПС *P. aeruginosa*, наблюдалось существенное уменьшение коэффициента де Ритис за счет резкого снижения активности АСТ, причем этот эффект более выражен для ЛПС вирулентных изолятов.

При добавлении к печеночному гомогенату растворов ЛПС наблюдалось увеличение коэффициента де Ритис, однако его значения ни в одной группе не достигали единицы. Коэффициент де Ритис увеличивался как за счет прироста активности АСТ, более значительного для ЛПС авирулентных изолятов, так и за счет

снижения активности АЛТ, более выраженного для ЛПС вирулентных изолятов *P. aeruginosa*. Увеличение коэффициента де Ритис было более значительным при внесении в среду растворов ЛПС вирулентных изолятов.

При добавлении к печеночному гомогенату культуральных жидкостей от перитонеальных клеток, обработанных липополисахаридами различных изолятов *P. aeruginosa*, коэффициент де Ритис во всех группах был выше единицы. При этом в случае ЛПС вирулентных изолятов он был выше, чем в контроле, главным образом за счет выраженного снижения активности АЛТ.

Можно сделать вывод, что клетки печени реагируют на изменение количества и активности макрофагов изменением трансаминазного профиля.

Список литературы

1. Williams B. J., Newkirk H. L. *Pseudomonas* infection of one-day chicken resalting from contaminated antibiotic solutions. *Avian Dis.* 1966. Vol. 10. P. 353–356.
2. Richards M. J. et al. Nosocomial infections in medical intensive care units in the United States. *National Nosocomial Infections Surveillance System // Crit. Care Med.* 1999. Vol. 27(5). P. 887–892.
3. Rossolini G. M., Mantengoli E. Treatment and control of severe infections caused by multiresistant *Pseudomonas aeruginosa* // *Clin. Microbiol. Infect.* 2005. Vol. 11 (Suppl. 4). P. 17–31.
4. Kang C. I. et al. *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia: risk factors for mortality and influence of delayed receipt of effective antimicrobial therapy on clinical outcome // *Clin. Infect. Dis.* 2003. Vol. 37. P. 745–751.
5. Osih R. B. et al. Impact of empiric antibiotic therapy on outcomes in patients with *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia // *Antimicrob Agents Chemother.* 2007. Vol. 51(3). P. 839–844.
6. Использование ПЦР в системе контроля псевдомоноза и пастереллеза сельскохозяйственной птицы: методические рекомендации / Н.А. Шкиль [и др.] / Сибирское отделение РАСХН. Новосибирск, 2007. 22 с.
7. Wiegel J., Mayer F. Isolation of Lipopolysaccharides and the Effect of Polymyxin B on the Outer Membrane of *Corynebacterium autotrophicum* // *Arch. Microbiol.* 1978. Vol. 118. P. 67–69.
8. Park B. H., Fikring S. M. Indefication and nitroblue tetrasolium reduction by neutrophils: 3 diagnostic act // *Lancet.* 1968. Vol. 11. P. 532 – 534.
9. Камышников В. С. Справочник по клинико-биохимической лабораторной диагностике: в 2 т. Т. 1. Минск, 2000. 495 с.