

УДК 612.017.4:616-002.71:593.95

ХАРАКТЕРИСТИКА ВОЗДЕЙСТВИЯ ТЕРМОЛАБИЛЬНОГО ЛЕТАЛЬНОГО ТОКСИНА *YERSINIA PSEUDOTUBERCULOSIS* НА ЭМБРИОГЕНЕЗ И БИОСИНТЕЗ ДНК, РНК И БЕЛКА В ЭМБРИОНАХ МОРСКОГО ЕЖА *STRONGYLOCENTROTUS INTERMEDIUS*

Н.А. Терентьева¹, Н.Ф. Тимченко², Е.В. Персиянова², В.А. Рассказов¹¹ Тихоокеанский институт биоорганической химии ДВО РАН (690022 г. Владивосток, пр-т 100 лет Владивостоку, 159),² НИИ эпидемиологии и микробиологии СО РАМН (690087 г. Владивосток, ул. Сельская, 1)

Ключевые слова: *Yersinia pseudotuberculosis*, термолabileный токсин, эмбрионы морского ежа, биосинтез нуклеиновых кислот и белка.

Исследовано действие термолabileного летального токсина *Yersinia pseudotuberculosis* на развитие эмбрионов морского ежа *Strongylocentrotus intermedius* и биосинтез нуклеиновых кислот и белка в эмбриональных клетках. Токсин влиял на метаболические процессы в клетке, ингибируя синтез ДНК и РНК, и практически не затрагивал белковый синтез. Токсин оказывал повреждающее действие на развивающиеся эмбрионы морского ежа, вызывая морфологические изменения и, как следствие, гибель эмбрионов.

Несмотря на то, что история исследования возбудителя псевдотуберкулеза насчитывает более 100 лет, вопрос о его токсинах остается открытым. К настоящему времени есть сведения о нескольких белковых токсинах *Yersinia pseudotuberculosis* [3], в том числе и о термолabileном летальном токсине (ТлТ), однако, роль этого токсина в патогенезе псевдотуберкулеза неясна. Остаются неизвестными его мишени и механизм действия на клетки макроорганизма. Целью настоящей работы явился анализ влияния термолabileного токсина *Y. pseudotuberculosis* на развитие эмбрионов морского ежа *Strongylocentrotus intermedius* на ранних этапах эмбриогенеза, а также действия токсина на биосинтез белка, ДНК и РНК в этих клетках.

Эмбрионы морских ежей являются удобным объектом для изучения различных физиологически активных веществ, в том числе при анализе их токсических эффектов [1]. К достоинствам этой модели относятся возможность получения больших партий гамет и синхронно развивающихся эмбрионов, относительная простота инкубации в контролируемых условиях, а также возможность визуального наблюдения эффекта воздействия различных соединений в ходе эмбрионального развития. Яйцеклетки морского ежа давно используются для изучения кинетики действия лекарственных препаратов. Спермии иглокожих служат уникальным объектом для определения токсичности различных веществ по их действию на подвижность гамет и их оплодотворяющую способность.

На ранних стадиях развития в клетках эмбрионов протекает интенсивный и достаточно синхронный синтез нуклеиновых кислот. Обладая способностью развиваться в морской среде без каких-либо доба-

вок, эмбрионы могут включать экзогенные предшественники в состав клеточных биополимеров [7]. Это дает возможность исследовать процессы биосинтеза нуклеиновых кислот и других биомолекул в эмбриональных клетках, а также действие на эти процессы различных агентов.

Материал и методы. Использован бесплазмидный штамм *Y. pseudotuberculosis* 2517 III серотипа (Mollaret, Франция). Токсин выделяли из штамма по методу, описанному Н.Ф. Тимченко и др. [3]. LD₅₀ токсина для мышей составила 0,3 мкг. Концентрацию белка в пробах определяли по М.М. Bradford [5]. В процессе исследования использовали жидкостный альфа-бета радиометр Tri-Carb фирмы PerkinElmer, шейкер S-3.02.10M (Латвия), микроскоп с фотоаппаратом Motic AE21, химически чистые реактивы, радиоактивно меченные нуклеозиды и аминокислоты производства «Изотоп» (Россия), фильтры GF/C фирмы Whatman (Англия). Для исследования взяты морские ежи *S. intermedius*, отловленные в заливе Петра Великого (Японское море). Работа проведена на Морской экспериментальной станции ТИБОХ ДВО РАН.

Яйцеклетки получали путем встряхивания морских ежей и стимуляции икрометания введением в целомическую полость 1 мл 0,5 М KCl. Яйцеклетки собирали в стеклянные стаканы объемом 100 мл с морской водой. Осевшую икру отмывали от KCl профильтрованной морской водой. Сперму получали, сильно встряхивая самцов морских ежей.

Для оплодотворения к суспензии яйцеклеток в морской воде при мягком перемешивании добавляли сперму. Степень оплодотворения определяли под микроскопом. Во всех экспериментах число оплодотворенных яйцеклеток составляло более 95 %. Оплодотворенные яйцеклетки отмывали профильтрованной морской водой от излишков спермы. Для развития эмбрионов в пенициллиновые флаконы вносили по 2,5 мл взвеси яйцеклеток в морской воде. Затем в опытные пробы добавляли разные концентрации испытуемого токсина. Образцы инкубировали при 20°C и непрерывном перемешивании с такой интенсивностью, чтобы эмбрионы не оседали на дно пробирки и не разбрызгивались по стенкам выше слоя жидкости. За развитием эмбрионов морских ежей наблюдали под микроскопом при 200-кратном увеличении (окуляр – 10×, объектив – 20×).

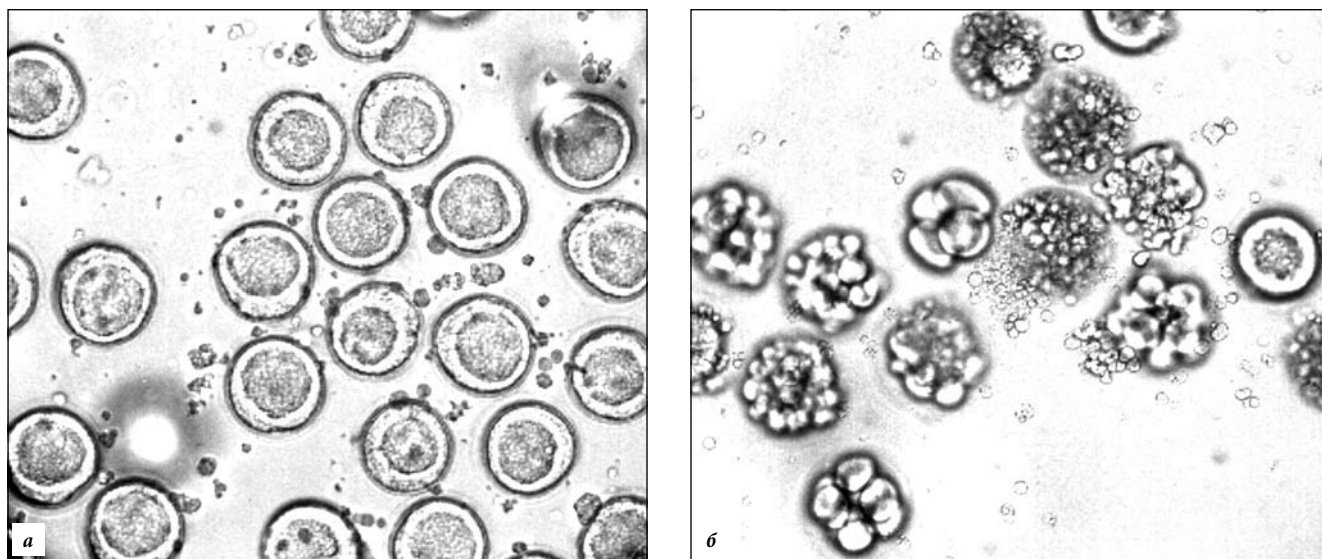


Рис. 1. Влияние термолabileльного летального токсина *Y. pseudotuberculosis* на развитие эмбрионов морского ежа *S. intermedius* после инкубации в течение 12 часов:

а – контроль без токсина, б – в присутствии 2 мкг/мл ТлТ. Световая микроскопия, $\times 200$.

Для исследования биосинтеза нуклеиновых кислот использовали $[^3\text{H}]$ -тимидин и $[^3\text{H}]$ -уридин, для изучения биосинтеза белка – $[^3\text{H}]$ -аланин или $[^3\text{H}]$ -лейцин. Меченые нуклеозиды или аминокислоты добавляли к суспензии эмбрионов до концентрации 5 мКи/мл. Через определенные промежутки времени до 24 часов с момента оплодотворения отбирали аликвоты по 0,2 мл. Реакцию останавливали добавлением равного объема холодной 10%-ной трихлоруксусной кислоты. Пробы выдерживали 30 мин при 4°C и собирали осадок фильтрованием через стеклянный фильтр GF/C. Фильтры последовательно промывали холодной 5%-ной трихлоруксусной кислотой (2 раза по 20 мл), 5 мл этанола и высушивали. Радиоактивность всех образцов определяли в толуольном сцинтилляторе: 1 л толуола, 4 г 2,5-дифенилоксазола, 0,1 г 1,4-ди-(5-фенил-2-оксазол)-бензола.

Результаты исследования. На первом этапе определения биологической активности термолabileльного летального токсина *Y. pseudotuberculosis* анализировалось влияние этого белка на оплодотворение яйцеклеток морского ежа и на развитие эмбрионов. Сперму морского ежа инкубировали в течение 30 мин в присутствии ТлТ в концентрации 2 мкг/мл. Затем сперми отмывали профильтрованной морской водой для удаления токсина и проводили оплодотворение необработанных яйцеклеток морского ежа. Процент оплодотворенных яйцеклеток контролировали под микроскопом. Аналогичный эксперимент проводили с прединкубацией яйцеклеток с токсином в тех же условиях. При инкубации сперматозоидов с токсином не было выявлено влияния последнего на их оплодотворяющую способность, а также на подвижность. Оплодотворение, как и в контроле (без токсина), составило более 95 %. Обработка токсином яйцеклеток морского ежа не препятствовала их оплодотворению спермой, но влияла на дальнейшее развитие эмбрионов.

Далее, для изучения действия ТлТ на развитие эмбрионов токсин в конечной концентрации 1, 2 и 4 мкг/мл вносили в суспензию оплодотворенных и отмытых от избытка спермы яйцеклеток. Плотность суспензии составляла ~ 2500 эмбрионов на 1 мл морской воды.

Под влиянием ТлТ *Y. pseudotuberculosis* происходило формирование ряда морфологических изменений эмбрионов *S. intermedius* (рис. 1). На стадии 2–4 бластомеров обнаружено появление единичных эмбрионов с клетками разного размера. На стадии 4–8 бластомеров появлялись уродливые формы эмбрионов (10–15 %), у которых клетки отделялись друг от друга, образуя рыхлую структуру. Через 4 часа изменялись уже до 40 % эмбрионов. На этой стадии можно было наблюдать увеличенные, округлившиеся клетки, отделившиеся от эмбриона и вышедшие в среду через разорванную оболочку. Некоторые эмбрионы останавливались на стадии 4–8 бластомеров и далее не делились. Однако, несмотря на резкие изменения морфологии под влиянием ТлТ, клетки продолжали делиться до тех пор, пока не наступал полный распад эмбрионов.

Подобные изменения наблюдались и в экспериментах, когда развивающиеся эмбрионы были получены из яйцеклеток, обработанных токсином до их оплодотворения. Если же прединкубации с токсином подвергались сперматозоиды, то эмбрионы, полученные из оплодотворенных ими яйцеклеток, развивались синхронно с контрольными, видимых изменений морфологии при этом не наблюдалось.

Для изучения действия ТлТ *Y. pseudotuberculosis* на биосинтез ДНК и РНК в клетках исследовали включение $[^3\text{H}]$ -тимидина и $[^3\text{H}]$ -уридина в состав нуклеиновых кислот эмбрионов (рис. 2, 3). Уровень включения радиоактивно меченного тимидина в ДНК возрастал практически линейно в течение 4 часов

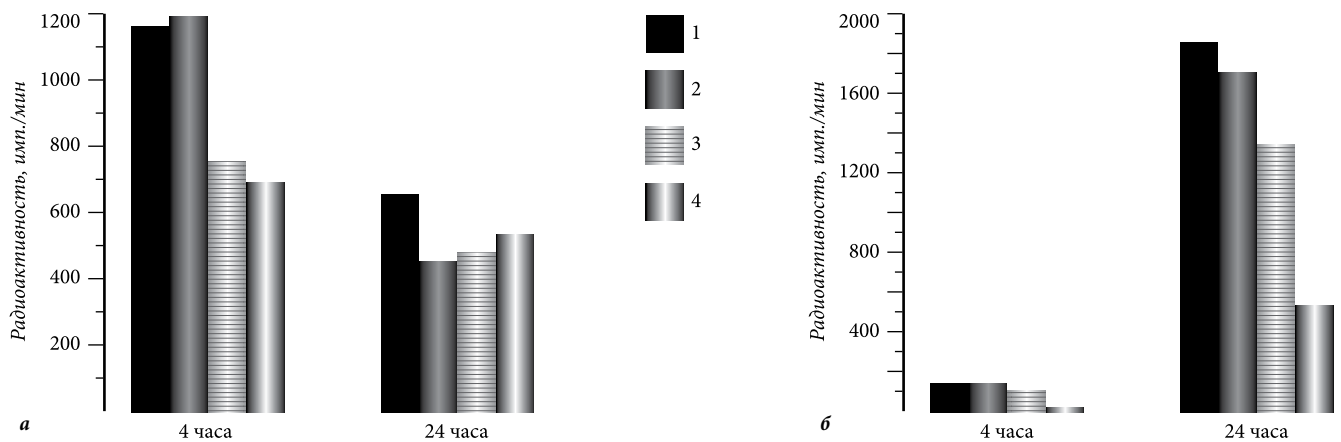


Рис. 2. Влияние термолabileного летального токсина *Y. pseudotuberculosis* на включение [^3H]-тимидина (а) и [^3H]-уридина (б) в нуклеиновые кислоты клеток эмбрионов морского ежа *S. intermedius*:

1 – контроль; 2, 3, 4 – включение радиоактивного нуклеозида в присутствии 0,5, 1 и 2 мкг токсина соответственно.

развития эмбрионов. Затем интенсивность включения предшественника снижалась. В течение 1 часа после оплодотворения включения [^3H]-уридина в состав нуклеиновых кислот не регистрировалось. Затем начался медленный рост этого показателя. Через 24 часа общий уровень радиоактивности в эмбрионах превышал более чем на порядок включение уридина через 6 часов развития.

Через 4 часа инкубации с ТлТ наблюдалось снижение уровня включения экзогенного тимидина, начиная с дозы 1 мкг. Небольшое ингибирование синтеза ДНК токсином сохранялось и через сутки развития эмбрионов. В ответ на включение экзогенного уридина в клетки эмбрионов также наблюдался ингибирующий эффект вплоть до 24 часов инкубации (рис. 2).

Интенсивность накопления [^3H]-аланина в белке развивающихся эмбрионов возрастала в течение 24 часов. Присутствие ТлТ на биосинтез белка практически не влияло. Лишь через сутки наблюдалось незначительное снижение уровня включения аминокислоты (рис. 3). Аналогичные результаты получены и при использовании в качестве предшественника биосинтеза белка радиоактивно меченного лейцина.

Обсуждение полученных данных. Таким образом, ТлТ *Y. pseudotuberculosis* не снижал подвижности спермиев, а также не влиял на их оплодотворяющую способность. Однако прединкубация яйцеклеток морского ежа с токсином действовала на дальнейшее развитие эмбрионов. Возможно, это связано с разной проницаемостью клеточных оболочек спермиев и яйцеклеток. Действие ТлТ на развивающиеся эмбрионы проявлялось в изменениях их морфологии. Наряду с появлением аномальных эмбрионов наблюдались эмбрионы, развитие которых останавливалось на стадии 4 или 8 бластомеров. При длительной инкубации с токсином разрушалась оболочка эмбрионов и наступала их гибель.

Для поиска мишени действия ТлТ мы исследовали их действие на скорость синтеза таких клеточных биополимеров, как ДНК, РНК и белок. Специфическим индикатором синтеза ДНК, а также клеточного

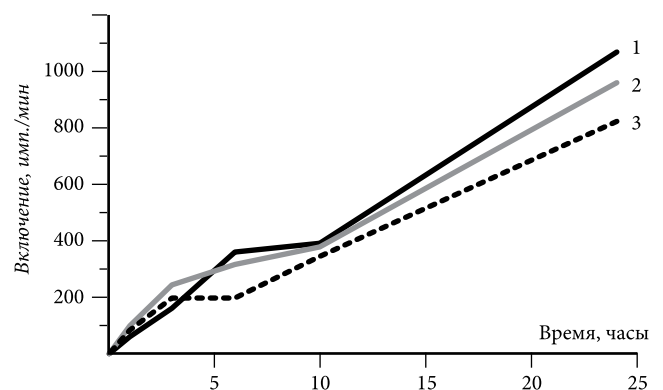


Рис. 3. Действие термолabileного летального токсина *Y. pseudotuberculosis* на включение [^3H]-аланина в белок клеток эмбрионов морского ежа *S. intermedius*:

1 – контроль без токсина; 2, 3 – включение радиоактивной аминокислоты в присутствии 2 и 4 мкг/мл токсина соответственно.

роста считается включение радиоактивно меченного тимидина, поскольку тимидин является специфическим предшественником ДНК и в другие макромолекулы напрямую не включается. Биосинтез ДНК в эмбрионах является в основном репликативным [6], что делает их привлекательной моделью для исследования веществ, влияющих на этот процесс. По включению радиоактивного уридина можно судить о скорости синтеза РНК в клетке.

Было обнаружено ингибирующее действие ТлТ *Y. pseudotuberculosis* на включение экзогенных нуклеозидов в клетки эмбрионов морского ежа, что может свидетельствовать о его влиянии на биосинтез нуклеиновых кислот. На первых этапах эмбрионального развития происходит очень интенсивный синтез ДНК, необходимый для быстрого деления клеток. Клетки делятся, не успевая увеличиваться в размерах. Увеличение уровня включения уридина через сутки говорит об интенсивных метаболических процессах, связанных с биосинтезом РНК. Это подтверждается и ростом уровня синтеза белка в эмбриональных клетках. На биосинтез белка ТлТ в концентрации до 4 мкг/мл практически не влиял. В то же время меньшие концентрации токсина снижали уровень

включения меченых нуклеозидов. Ингибирование включения радиоактивно меченных тимидина и уридина может свидетельствовать о влиянии ТлТ на биосинтез ДНК и РНК.

Ранее на развивающихся эмбрионах морского ежа *S. intermedius* исследовано действие термостабильного летального токсина *Y. pseudotuberculosis* – белка молекулярной массой 45 кД, вызывающего гибель мышей [2, 3]. Этот токсин не влиял на включение радиоактивно меченных тимидина и уридина в нуклеиновые кислоты эмбрионов морского ежа в интервале концентрации от 10 до 200 мкг/мл [4]. Для того чтобы исключить возможное влияние проницаемости оболочки оплодотворения клетки, были проведены контрольные эксперименты на ядрах, изолированных из эмбрионов морского ежа, в которых идет в основном репликативный синтез ДНК [6]. Данные, полученные в эксперименте *in vitro*, подтвердили отсутствие действия термостабильного токсина на синтез нуклеиновых кислот. В то же время этот токсин ингибировал биосинтез белка в эмбрионах морского ежа [4]. При концентрации токсина 50 мкг/мл эффективность включения меченых аминокислот снижалась на ~70 %. Высокие концентрации токсина, необходимые для ингибирования белкового синтеза, возможно, обусловлены скоростью проникновения его в клетки. На ранних стадиях развития эмбрионы морского ежа окружены оболочкой оплодотворения, и она может являться природным барьером для проникновения токсина в клетку.

Термостабильный токсин *Y. pseudotuberculosis* также влиял на эмбриогенез и повреждал эмбрионы морского ежа. При инкубации с различными концентрациями этого токсина происходила остановка клеточного деления некоторых эмбрионов на стадии 4–8 бластомеров. Однако, как и в случае с ТлТ, неповрежденные эмбрионы не прекращали своего развития. Это может быть связано с тем, что яйцеклетки морского ежа содержат все компоненты, необходимые для запуска основных процессов биосинтеза макромолекул сразу после оплодотворения. В ходе дальнейшего развития разрушалась оболочка, и эмбрионы гибли через 36–48 часов инкубации с токсинами *Y. pseudotuberculosis*.

Термостабильный и термолabile белковые токсины бактерий псевдотуберкулеза отличаются друг от друга по молекулярной массе, отношению к температуре, биологическим свойствам [3]. По всей вероятности, это может обуславливать и различие мишеней их действия на эукариотических клетках.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что оба белковых токсина *Y. pseudotuberculosis* оказывают влияние на развитие эмбрионов морского ежа *S. intermedius*, вызывая тяжелые морфологические повреждения, остановку эмбриогенеза на ранних этапах, разрушение клеток и гибель эмбрионов. Однако механизмы воздействия этих токсинов на развитие эмбрионов морского ежа различаются.

Если термостабильный токсин угнетает синтез белка, не затрагивая биосинтез нуклеиновых кислот, то ТлТ практически не влияет на белковый синтез, но ингибирует синтез ДНК и РНК. Однако меченые нуклеозиды претерпевают внутри клетки сложные метаболические превращения, и это не дает возможности конкретизировать мишень действия токсина. Ингибирующее действие может быть обусловлено влиянием его на ферменты полимеризации ДНК или РНК или на биосинтез предшественников нуклеиновых кислот. Можно предположить, что ингибирование синтеза ДНК и РНК в клетках развивающихся эмбрионов может являться частью механизма реализации действия термолabile токсина бактерий *Y. pseudotuberculosis*. Для выяснения механизма действия токсина необходимы эксперименты с индивидуальными ферментами, что является предметом нашей дальнейшей работы.

Литература

1. Бузников Г.А., Подмарев В.И. Морские ежи *Strongylocentrotus drobachensis*, *S. nudus*, *S. intermedius* // Объекты биологии развития. М: Наука, 1975. С. 188–216.
2. Недашковская Е.П., Тимченко Н.Ф., Беседнов А.Л., Вертмиев Ю.В. Термостабильный токсин *Yersinia pseudotuberculosis*: выделение, очистка, характеристика свойств // Журн. микробиол. эпидемиол. иммунобиол. 1995. № 4. С. 5–9.
3. Тимченко Н.Ф., Недашковская Е.П., Долматова Л.С., Сомова-Исачкова Л.М. Токсины *Yersinia pseudotuberculosis*. Владивосток, 2004. 219 с.
4. Тимченко Н.Ф., Терентьев Л.Л., Недашковская Е.П. и др. Действие термостабильного токсина *Yersinia pseudotuberculosis* на биосинтез ДНК, РНК и белка в эукариотических клетках // Эпидемиология и инфекц. болезни. 2002. № 1. С. 22–25.
5. Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye-binding // Anal. Biochem. 1976. Vol. 72. P. 248–254.
6. Kukhanova M., Krayevsky A., Terentyeva N., Rasskazov V. Inhibition of replicative DNA synthesis in nuclei of *Strongylocentrotus intermedius* urchin embryos by 2',3'-dideoxy-3'-aminonucleoside-5'-triphosphates // Biochim. Biophys. Acta. 1984. Vol. 783. P. 221–226.
7. Suzuki N., Mano Y. Phosphorylation of deoxyribonucleosides and DNA synthesis in early cleaving embryos of the sea urchin // J. Biochem. 1974. Vol. 6. P. 1349–1362.

Поступила в редакцию 12.02.2010.

CHARACTERIZING EFFECT OF THERMOLABILE LETHAL TOXIN *YERSINIA PSEUDOTUBERCULOSIS* ON EMBRYOGENESIS AND BIOSYNTHESIS OF DNA, RNA AND PROTEIN IN EMBRYOS OF SEA URCHIN *STRONGYLOCENTROTUS INTERMEDIUS*

N.A. Terentieva¹, N.F. Timchenko², E.V. Persiyanova², V.A. Rasskazov¹

¹ Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, FEB RAS (159 100 Aniv. Of Vladivostok Av. Vladivostok 690022 Russia), ² Research Institute of Epidemiology and Microbiology, SB RAMS (1 Selskaya St. Vladivostok 690087 Russia)

Summary – The paper discusses effect of thermolabile lethal toxin in *Yersinia pseudotuberculosis* on embryogenesis of sea urchins *Strongylocentrotus intermedius* and biosynthesis of nucleic acids and proteins in embryo cells. As shown, the toxin has effect on metabolic processes in cells by inhibiting synthesis of DNA and RNA, and almost does not affect protein synthesis. The toxin is of damaging action on sea urchin embryos in development and causes morphological changes, thus leading to embryonic death.

Key words: *Yersinia pseudotuberculosis*, thermolabile lethal toxin, sea urchin embryos, biosynthesis of nucleic acids and proteins.