

О.С. Броварская, Л.Д. Варбанец, д.б.н.

ЛИПОПОЛИСАХАРИД *RALSTONIA SOLANACEARUM* ICMР 8115: ХАРАКТЕРИСТИКА И ЭНДОТОКСИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ

Институт микробиологии и вирусологии НАН Украины, г. Киев

Первым барьером, который защищает бактерии от антимикробных веществ и стрессов, вызванных изменениями в окружающей среде, являются биополимеры клеточной поверхности. Многие из них являются детерминантами вирулентности, патогенности, токсичности, антигенности и др. Поэтому, чтобы понять молекулярные основы взаимодействия бактерий с клетками хозяина, необходимо знать молекулярную структуру клеточной поверхности бактерий, а также понять, как бактерии модифицируют эту структуру в ответ на изменение окружающей среды. Такими молекулами поверхности, которые подвергаются структурным изменениям как при симбиозе, так и патогенезе, являются липополисахариды (ЛПС), известные как эндотоксины. Они играют существенную роль в организации и функционировании клеточной поверхности. ЛПС не только являются основными антигенами бактериальной клетки, но играют важную роль в определении специфичности каналов, ответственных за транспорт необходимых для роста клетки веществ, защищают ее от летального действия некоторых антибиотиков, детергентов, ядов, действуют как рецепторные участки для некоторых специфических бактериофагов и бактериоцинов. В последние годы получены новые данные о важной роли эндотоксинов в физиологии и патогенезе важнейших заболеваний человека как инфекционной, так и неинфекционной природы. Такая полифункциональная роль ЛПС объясняет тот интерес, которые исследователи проявляют к изучению их состава, строения и биологических свойств.

Задачей данной работы было химически идентифицировать липо-

полисахарид *Ralstonia solanacearum*, изучить его некоторые токсические свойства.

Материалы и методы исследования

Объектом исследований был штамм *Ralstonia solanacearum* 8115, любезно предоставленный нам доктором J. Young, куратором ICMР (New Zealand), за что выражаем глубокую благодарность.

Культуру *R. solanacearum* выращивали при 28°C на синтетической среде N [1] в течение 36-40 ч в условиях качалок (240 об./мин). Клетки осаждали центрифугированием при 5000 x g в течение 40 мин, высушивали обработкой ацетоном и эфиром. ЛПС экстрагировали из сухих клеток водно-фенольным методом [2]. Водный слой диализовали против водопроводной, затем дистиллированной воды. Нуклеиновые кислоты удаляли путем осаждения 50% раствором трихлоруксусной кислоты. Очищенный от нуклеиновых кислот ЛПС лиофилизировали.

ЛПС анализировали на наличие редуцирующих веществ, 2-кето-3-дезоксикетозулозоновой кислоты (КДО) [3], белка [4] и нуклеиновых кислот [5]. Содержание углеводов определяли методом [6].

Для идентификации нейтральных моносахаридов препараты гидролизовали 2 N HCl в течение 5 ч при 100°C, а затем анализировали методом газожидкостной хроматографии (ГЖХ) в виде ацетатов полиолов на хромато-масс-спектрометрической системе Egilent 6890N/5973 inert, колонка PB-225 mS 30м x 0,25мм x 0,25мм, газ носитель — гелий, поток через колонку 1мл/мин. Температура испарителя — 250°C, интерфейса — 280°C, термостата — 220°C (режим изотермический).

Пробу вводили с делением потока 1:100. Идентификацию моносахаридов проводили путем сравнения времени удерживания ацетатов полиолов исследуемых образцов и стандартных, а также с использованием компьютерной базы данных ChemStation. Количественное соотношение индивидуальных моносахаридов определяли в процентах к сумме площадей всех пиков моносахаридов.

Содержание аминокислот и гексозаминов определяли после гидролиза в 6 N HCl в течение 20 ч при 100 °C на анализаторе аминокислот KLA-5 ("Hitachi", Япония).

Антисыворотки к прогретой в течение 2,5 ч при 100°C культуре *R. solanacearum* получали в результате трех внутримышечных инъекций кроликам возрастающими дозами суспензии микробных тел с полным адьювантом Фрейнда (8 x 10⁹ кл/мл, от 0,5 до 0,7 мл) и одной внутривенной иммунизации (1 x 10⁶ кл/мл) с интервалами между инъекциями 3-7 суток. Забор крови у животных проводили на 7 день после последней иммунизации.

Двойную иммунодиффузию в агаре проводили согласно Ouchterlony [7], используя 1,2%-ный раствор агарозы в физрастворе.

Токсичность ЛПС (ЛД₅₀) исследовали на белых нелинейных мышцах, сенсибилизированных Д-галактозамином.

Пирогенность ЛПС изучали на кроликах путем внутривенного введения установленной минимальной пирогенной дозы ЛПС с последующей термометрией животных в течение 3 часов.

Дефосфорилирование проводили выдерживанием ЛПС в 40% плавиковой кислоте в течение 24 часов при 4°C. Реакционную смесь ресуспендировали небольшим количеством воды, доводили до нейтрального значения pH при помощи анионообменной смолы Дауэкс 1x4 в CO₃⁻ форме, смолу отделяли фильтрацией через стеклянный фильтр, фильтрат замораживали и лиофильно высушивали [8].

N,O-деацелирование препаратов ЛПС проводили безводным гидразином в присутствии серноуксусного гидразина на протяжении 40 часов при 100°C. Затем смесь нейтрализовали 3 N HCl до нейтрального значения pH. Экстрагировали

хлороформом, водную часть диализовали против дистиллированной воды, упаривали, замораживали и лиофильно высушивали [9].

При сукцинировании ЛПС гидролизовали 1 мин при 100°C с перегнанным пиридином. После охлаждения до комнатной температуры к пробе добавляли янтарный ангидрид в пиридине (в соотношении 100 мг и 4 мл соответственно). Выдерживали 30с при 100°C. Затем гидролизовали 3 ч при 56°C, охлаждали до комнатной температуры, нейтрализовали 0,1 N NaOH до pH 7,0, диализовали против дистиллированной воды и лиофильно высушивали [10].

Результаты и их обсуждение

Из *R. solanacearum* водно-фенольным методом выделяли ЛПС, которые характеризовались достаточно высоким содержанием нуклеиновых кислот (до 35%), что вполне логично, учитывая особенности метода выделения. Очистку ЛПС от нуклеиновых кислот проводили при помощи 50 % раствора трихлоруксусной кислоты, которая образовывала нерастворимые комплексы с нуклеиновыми кислотами. Однако, при использовании этого метода потери ЛПС были большими, так как определенная часть его выпадала в осадок вместе с нуклеиновыми кислотами. Выход ЛПС от сухих клеток составлял 4,0%. Очищенные ЛПС содержали 45% углеводов, 1,5% нуклеиновых кислот и следовые количества белка.

Анализ моносахаридного состава ЛПС показал (табл.1), что доминирующим моносахаридом была рамноза (64,2%), которая часто встречается в составе ЛПС видов *Pseudomonas*, *Burkholderia* [11]. Глюкоза (14,4%) и ксилоза (7,8%) также обнаружены. Кроме указанных моносахаридов, в ЛПС *R. solanacearum* выявлены и менее распространенные для данного вида углеводные остатки. Так, необходимо отметить наличие в составе ЛПС рибозы (1,7%). Поскольку благодаря очистке было достигнуто уменьшение содержания нуклеиновых кислот до 1,5%, исключается возможность загрязнения рибозой нуклеиновых кислот. Более вероятно, что она действительно входит в состав ЛПС указанных штаммов. Недавно рибоза была обнаружена в составе ЛПС

E.coli [12]. В ЛПС *R. solanacearum* выявлены достаточно высокие количества глюкозамина (8,4 %) и незначительные — галактозамина (0,5%). Характерным компонентом ЛПС исследуемого штамма *R. solanacearum* является гептоза (5,0%). Что касается КДО, то, как видно из приведенных в таблице 1 данных, в не-deградированных ЛПС она присутствует в незначительных количествах (0,34%). Согласно современным представлениям, ЛПС всех изученных грамотрицательных бактерий содержат, по крайней мере, один остаток КДО или его производное. Бактерии с дефектом в биосинтезе КДО не являются жизнеспособными. Невозможность выявить КДО в молекуле ЛПС обусловлена теми проблемами, с которыми исследователи сталкиваются при химическом анализе КДО. Функциональные группы КДО могут быть замещены другими остатками, что затрудняет ее идентификацию. Так, если КДО замещена в положении 4 (или 5) фосфатной группой, а в положении 5 (или 7) углеводной цепью, невозможно образование ее фрагмента ОНС-CH₂-CO-COOH, который дает положительную реакцию с тиобарбитуровой кислотой [13]. Аминокислоты определялись в следовых количествах.

Таким образом, установлено, что изолированный из *R. solanacearum* ЛПС содержал все характерные для этих биополимеров компоненты.

Как известно, ЛПС состоит из трех структурных компонентов: О-

специфического полисахарида, олигосахарида кора и липида А, который является эндотоксическим центром молекулы ЛПС, ответственным за такие свойства, как токсичность и пирогенность.

Для оценки токсичности ЛПС определяли дозу препарата, которая при внутрибрюшинном введении мышам, сенсibilизированным Д-галактозамингидрохлоридом, вызывала гибель 50% животных (ЛД₅₀). Исследованные препараты ЛПС проявляли токсичность в дозе 15 мкг/мышь. Полученные результаты указывают на меньшую токсичность ЛПС *R. solanacearum* по сравнению с ЛПС других фитопатогенов. Подобную токсическую активность проявляли только некоторые штаммы *Pseudomonas fluorescens*, в то время как ЛПС *Pseudomonas wiewingae* были приблизительно в 30 раз более токсичны, а ЛПС *Pseudomonas syringae* — приблизительно в 500 раз токсичнее ЛПС исследованного штамма *R. solanacearum* [14].

Другое характерное проявление токсических свойств ЛПС — высокая пирогенность. Внутривенное введение ЛПС сопровождается повышением через определенный период температуры тела. Человек и кролик наиболее чувствительны к пирогенному действию эндотоксина [15]. Для проведения сравнительной оценки пирогенных характеристик исследуемого ЛПС при внутривенном введении кролям в серии разведений была установлена минимальная пирогенная доза, которая соста-

Таблица 1

Моносахаридный состав липополисахарида *R. solanacearum* шт. 8115

Моносахариды	Липополисахарид
% к сумме площадей пиков	
Рамноза	64,2±0,3
Рибоза	1,7±0,1
Арабиноза	0,3±0,1
Ксилоза	7,8±0,1
Глюкоза	14,4±0,5
Гептозы	5,0±0,1
% к сухому весу препарата	
Глюкозамин	8,4±0,3
Галактозамин	0,5±0,1
КДО	0,34±0,2

вила $7,5 \times 10^{-3}$ мкг ЛПС/мл непиrogenного изотонического раствора.

Результаты термометрии (табл. 2) показали, что повышение температуры у животных более чем на $0,45^{\circ}$ вызывал нативный ЛПС *R. solanacearum* шт. 8115. На протяжении первого часа его введения наблюдалось резкое повышение температуры у животных на $+0,73^{\circ}\text{C}$. На второй и третий час наблюдалось дальнейшее повышение температуры ($+1,11$ и $+1,32^{\circ}\text{C}$ соответственно).

Одним из наиболее актуальных вопросов современной гликобиологии является выяснение ответственности определенных химических группировок в составе ЛПС за проявление того или иного вида биологической активности, что может быть полезным при создании новых лекарственных препаратов и получении химически модифицированных ЛПС, которые бы сохраняли высокую имунотропную активность, но не проявляли токсичность и пирогенность.

Для решения этой задачи нами были получены модифицированные препараты ЛПС исходного штамма *R. solanacearum* шт. 8115 путем N-, O-деацилирования и дефосфорилирования. При химической модификации ЛПС утрачивал токсичность, а пирогенная активность была на уровне фармацевтического препа-

рата "Пирогенал" (табл. 2, 3).

Для детоксикации ЛПС был модифицирован также методом сукцинилирования. При такой модификации возможно взаимодействие трех сукцинильных групп с гидроксильными группами липида А: двух 3-ОН- $\text{C}_{14:0}$ жирных кислот в положениях C2 и C3, а также одной при C4 GlcNAc. Введение сукцинильных групп повышает гидрофильность липида А, поскольку увеличение незаменимых карбоксильных групп, которые обладают высокой полярностью, приводит к снижению способности образовывать агрегаты, так называемые надмолекулярные структуры ЛПС. Это приводит к изменению биологической активности. Сравнительное изучение токсичности исходного и модифицированного ЛПС свидетельствует о том, что последний полностью потерял свою токсичность. Этот модифицированный ЛПС был использован в качестве антагониста токсической активности исходного ЛПС *R. solanacearum* шт. 8115. Показано, что предварительное введение модифицированного ЛПС в дозе 15 мкг/мышь за 1 час до введения исходного ЛПС снимало летальный эффект последнего. Уменьшение дозы модифицированного ЛПС в два раза также защищало животных от токсического действия исходного ЛПС.

При проведении серологических исследований в качестве антител использовали кроличьи поликлональные антисыворотки, полученные к прогретой культуре штамма *R. solanacearum*. Антигеном служил ЛПС, выделенный из этого штамма. В реакциях кольцепреципитации и агглютинации были определены титры исследуемых O-антисывороток, которые составляли 1:80000 и 1:3200 соответственно.

Как видно из представленных данных (рисунок), полученных в реакциях двойной иммунодиффузии в агаре по Оухтерлони, ЛПС исследуемого штамма характеризовался слож-

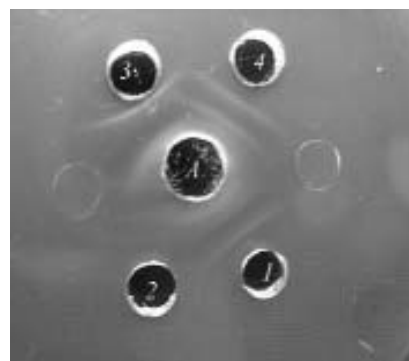


Рис. Двойная иммунодиффузия в агаре по Оухтерлони

А- O-антисыворотка к шт.8115

1- нативный ЛПС

2- сукцинилированный ЛПС

3- дефосфорилированный ЛПС

4- N,O-деацилированный ЛПС

Таблица 2

Токсичность нативного и модифицированных ЛПС
R. solanacearum шт. 8115

Препарат	Доза ЛПС, мкг/мышь	Летальность животных
Нативный ЛПС	15	50%
Дедосфорилированный ЛПС	50	Все живы
N-,O-деацилированный ЛПС	50	Все живы
Сукцинилированный ЛПС	50	Все живы
ЛПС <i>E. coli</i> O55:B5	0,14	50%

Таблица 3

Пирогенность нативного и модифицированных ЛПС *R. solanacearum* шт.8115

Препарат	Доза ЛПС, мкг/мл	Изменение температуры, $^{\circ}\text{C}$		
		1 час	2 час	3 час
Нативный ЛПС	$7,5 \times 10^{-3}$	$+0,73$	$+1,11$	$+1,32$
Дедосфорилированный ЛПС	$7,5 \times 10^{-3}$	$+0,9$	$+0,9$	$+0,4$
N-,O-деацилированный ЛПС	$7,5 \times 10^{-3}$	$+0,22$	0	0
Сукцинилированный ЛПС	$7,5 \times 10^{-3}$	$+0,9$	$+1,0$	$+0,52$
"Пирогенал"	$7,5 \times 10^{-3}$	$+0,59$	$+0,69$	$+0,71$

ным антигенным составом и содержал от 1 до 2 антигенных факторов, выявленных визуально. Можно сделать вывод, что ЛПС исследуемого штамма *R. solanacearum* в гомологичных системах проявлял активность антигена. Сравнительное изучение серологической активности нативного и модифицированных ЛПС свидетельствует о том, что дефосфорилиро-

вание и деацилирование не оказывает влияние на серологическую активность, в то время как сукцинилирование приводит к полной ее потере.

Таким образом, из *R. solanacearum* шт. 8115 выделен липополисахарид, содержащий рамнозу, глюкозу, ксилозу, гептозу и КДО, то есть все характерные для этих биополимеров моносахаридные компо-

ненты. Установлено, что, как и ЛПС других грамотрицательных бактерий, ЛПС *R. solanacearum* проявляет токсичность и пирогенность, за которые ответственны ацильные, фосфатные и свободные гидроксильные группы липида А. Показана возможность использования модифицированных ЛПС для блокирования токсических эффектов нативных биополимеров.

ЛИТЕРАТУРА

1. Vidaver A. Synthetic and complex media for the rapid detection of fluorescence of phytopathogenic pseudomonas: effect of the carbon source. // Appl. Microbiol. — 1967. — 15, №16. — P.1523-1524.
2. Вестфаль О., Янн К. Бактериальные липополисахариды. /Материалы исследования углеводов. — М.: Мир, 1975. — С.325-333.
3. Захарова И.Я., Косенко Л.В. Методы изучения микробных полисахаридов. — Киев: Наукова думка, 1982. — 201 с.
4. Lowry O., Rosenbrough N., Farr A., Randall R. Protein measurement with the Folin reagent. // J.Biol.Chem. — 1951. — 193, №1. — P.265-275.
5. Спирин А.С. Определение нуклеиновых кислот. // Биохимия. — 1958. — 23, №5. — С.562-662.
6. Dubois M., Gilles K., Hamilton J., Rebers P.A., Smith F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. // Anal.Chem. — 1956. — 28, №2. — P.350-356.
7. Ouchterlony O. Diffusion in gel methods for immunological analysis // Prog. Allergy. — 1962. — 6. -P. 3-15.
8. Шашков А.С., Стрешинская Г.М., Наумова И.Б. и др. Фосфорсодержащий полисахарид клеточной стенки *Actinoplanes* sp. UNA 3697 // Биохимия. — 1993. — 58, № 2. — С. 202-210.
9. Tanamoto K., Ichibashi N. Succinylated lipid A is potent specific inhibitor of endotoxin mitogenicity // J. General Microbiol. — 1992. — 138. — P.2503-2508.
10. Galanos C., Tanaka A. Biological activities of chemically modified endotoxins. // Eur.J.Biochem. — 1971. — 22. — P.218-224.
11. Janson P.E. The chemistry of O-polysaccharide chain in bacterial lipopolysaccharides. // Endotoxin in Health and Disease.-Eds. Brade H., Opale S., Vogel S., Morrison D.-Marcel Dekker, Inc. — New York — Basel, 1999. — 928 p.
12. Ratnayake S., Weintraub A., Widmalm G. Structural studies of the enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) 0153 O-antigenic polysaccharide. // Carbohydr. Res. — 1994. — 265. — P. 113-120.
13. Caroff M., Lebbar S., Szabo L. Do endotoxins devoid of 3-deoxy-D-manno-2-octulosonic acid exist. // Biochem Biophys. Res. Commun. — 1987. — 143, №3. — P. 845-847.
14. Zdrovenko G., Vodyanik M., Yakovleva L., Chernyshov V. Biological activities on mammals of *Pseudomonas syringae* lipopolysaccharides in connection with structural features of macromolecule. / 10th Europ. Carbohydr. Symp. — Proc. (Galway, Ireland, 11-16 July, 1999). — Galway, 1999. — P.134.
15. Wolff S.M. Biological effects of bacterial endotoxins in man. // J Infect Dis. — 1973. — 128, №1. — Suppl:259-64.

О.С.Броварська, Л.Д. Варбанець

ЛИПОПОЛИСАХАРИД *RALSTONIA SOLANACEARUM* ICMP 8115: ХАРАКТЕРИСТИКА І ЕНДОТОКСИЧНА АКТИВНІСТЬ

Виділений і вивчений ліпополісахарид (ЛПС) *Ralstonia solanacearum* ICMP 8115. Домінуючими моносахаридами ЛПС є рамноза (64,2%), глюкоза (14,4%), гептоза (5,0%). 2-кето-3-дезоксіоктулозонова кислота (КДО) і глюкозамін також присутні. Подібно до інших грамнегативних бактерій, ЛПС *R.solanacearum* притаманні токсичність і пирогенність. Встановлено, що за токсичність і пирогенність відповідають ацильні, фосфатні і вільні гідроксильні групи ліпиду А. Встановлено, що модифікований методом сукцинілювання ЛПС виступає як антагоніст токсичної активності нативного ЛПС. Попереднє введення модифікованого ЛПС в дозі 15 мкг/миш (токсична доза нативного ЛПС) за 1 год до введення нативного ЛПС попереджало летальний ефект. Показана можливість використання модифікованих ЛПС блокувати токсичні ефекти нативних біополімерів.

O.S. Brovarskaya, L.D. Varbanets

RALSTONIA SOLANACEARUM ICMP 8115 LIPOPOLYSACCHARIDE: CHARACTERIZATION AND ENDOTOXIC ACTIVITY

Lipopolysaccharide (LPS) of *Ralstonia solanacearum* ICMP 8115 has been isolated and characterized. The predominant monosaccharides of LPS were rhamnose (64,2%), glucose (14,4%), heptose (5,0%). 2-keto-3-deoxyoctulosonic acid and glucosamine were also present. As others gramnegative bacteria, LPS of *R. solanacearum* exerted toxicity and pyrogenicity. It was shown that acyclic, phosphate and free hydroxylic groups of lipid A are responsible for toxicity and pyrogenicity. Investigations on experimental animals indicated the modified by succinylation LPS may act as antagonist of endotoxic activity of native LPS. Preliminary injection of modified LPS protect experimental animals from lethal effect of native LPS.

This way, the possibility of usage of modified LPS to block the toxic effects of native biopolymers has been shown.