

В.В. Шубчинський, Л.Д. Варбанець, д.б.н., О.С. Броварська

## ЕНДОТОКСИЧНА АКТИВНІСТЬ ЛІПОПОЛІСАХАРИДІВ *PRAGIA* *FONTIUM*

Інститут мікробіології і вірусології НАН України, Київ

*Enterobacteriaceae* відносяться до родини мікроорганізмів найбільш вивчених фено- і генотипно, тим не менш їх систематика постійно змінюється і вдосконалюється. Так, в останні роки різними дослідниками [1, 2] із застосуванням як традиційних, так і сучасних методів хемо- і геносистематики були відкриті нові роди *Enterobacteriaceae*, які характеризуються різною спорідненістю з *Escherichia*. Одним з таких родів є *Pragia*, представлений видом *P. fontium*, який характеризується низькою спорідненістю з *Escherichia* (5% гомології ДНК), але на рівні різних родів однієї родини. Відомо, що одним із факторів патогенності грамнегативних бактерій є ліпополісахариди (ЛПС), які представляють собою складний глікокон'югат, розташований на зовнішній мембрані. ЛПС характеризуються широким спектром біологічної активності, в тому числі і ендотоксичної, зокрема пірогенністю, летальною токсичністю, реакцією Шварцмана, тощо. Молекула ЛПС складається з трьох частин: О-специфічного полісахариду, який обумовлює антигенну активність; олігосахариду кору, який відіграє суттєву роль в підтриманні цілостності зовнішньої мембрани; ліпиду А, який є ендотоксичним центром і відповідає за всі види ендотоксичної активності ЛПС. Оскільки ЛПС *P. fontium* вперше в світі були виділені і охарактеризовані нами раніше [3], метою даної роботи було дослідити токсичну і пірогенну активність ЛПС, а також вивчити, чи впливає жирнокислотний склад ліпідів А на ендотоксичну активність ЛПС.

### Матеріали і методи

Об'єктом дослідження було 8 штамів *Pragia fontium*, виділених з

води: питної, колодязної, річкової та води з водогону (табл. 1). Штами були люб'язно надані зав. відділом нових та маловивчених інфекцій інституту мікробіології та імунології АМН України к.м.н. С.І. Похилом.

Штами вирощували на синтетичному рідкому середовищі N [4], в умовах качалок (220 об./хв) при температурі 28 °С, на протязі 24 год.

Виділення та очистку ЛПС проводили водно-фенольним методом [5].

Для отримання ліпиду А проводили деградацію досліджуваних ЛПС (2 % оцтова кислота, 100 °С, від 2 до 6 год, в залежності від штаму). Ліпід А відділяли центрифугуванням при 15000 g, 30 хв.

При визначенні жирнокислотного складу наважку препарату (10 мг) розчиняли у 3 мл 1,5 % розчину хлористого ацетилю в метанолі (попередньо охолоджену) і гідролізували при температурі 100 °С в запаяних ампулах протягом 4 год. Метиллові ефіри жирних кислот екстрагували тричі гексаном (по 3 мл). Фракцію н-гексану відбирали і висушували на вакуумному випаровувачі [6]. Аналіз метилових ефірів жирних кислот проводили на хромато-мас-спектрометричній системі Agilent 6890N/5973 inert. Колонка HP-5MS, довжина 30 м, внутрішній діаметр 0,25 мм, товщина фази 0,25 мкм. Температурний режим 150-250 °С, градієнт температури 4 °С/хв, газ-носій - гелій, швидкість потоку через колонку 1,2 мл/хв. Температура випаровувача з поділом потоку 1:100. Обробку результатів проводили за допомогою персонального комп'ютера та стандартної суміші метилових ефірів жирних кислот (виробник Supelco, США).

Визначення токсичності ЛПС проводили на здорових білих мишах масою 19-21 г обох статей, раніше не задіяних в будь-яких дослідженнях.

Всім мишам вводили внутрішньоочеревинно 0,5 мл 3,2 %-вого розчину D-галактозамінгідрохлориду в непірогенному стерильному розчині 0,9 %-ного NaCl. Після чого негайно вводили внутрішньоочеревинно 0,2 мл підігрітого до 37 °С ЛПС в ізотонічному стерильному непірогенному фізіологічному розчині зі швидкістю 0,1 мл/с. В серії розведень ЛПС визначали дозу препарату, що викликала загибель 50 % тварин (LD<sub>50</sub>), яку використовували для оцінки токсичності ЛПС. Кожну серію розведень препарату ЛПС випробували на десяти мишах. Контрольній групі (10 мишей) вводили разом з D-галактозамінгідрохлоридом 0,2 мл стерильного розчину 0,9 %-ного NaCl. Спостереження за тваринами проводили протягом 48 год [7].

Пірогенну дію ЛПС вивчали на кролях масою 2,0-3,5 кг [7]. Термометрію проводили протягом 3 год зранку до годівлі за допомогою електронного термометру ("Omron Matsusaka Co. Ltd", Японія), який вводили в пряму кишку на глибину 5-7 см. Попередньо всіх кролів випробовували на реакцію при внутрішньовенному введенні 10 мл/кг 0,9 % стерильного непірогенного розчину хлориду натрію. Досліджувані препарати ЛПС розчиняли в стерильному непірогенному ізотонічному розчині, перед введенням витримували протягом 10 хв при 37 °С, після чого внутрішньовенно вводили з розрахунку 1 мл/кг маси тварини. Мінімальну пірогенну дозу препаратів ЛПС визначали в серії розведень від 0,5 до 1,0x10<sup>-2</sup> мг/мл. Кожну серію досліджуваних розчинів перевіряли на 3-х кролях, близьких за масою (які відрізнялись не більш, ніж 0,5 кг). Перед введенням розчину ЛПС у кролів двічі вимірювали температуру з інтервалом 30 хв. Оскільки різниця в показниках температури не повинна перевищувати 0,2 °С, тварин, що не відповідали цьому показнику, для дослідження не використовували. Результат останнього вимірювання приймали за вихідну температуру. Розчин ЛПС вводили не пізніше ніж через 15-20 хв після останнього вимірювання температури. Наступні вимірювання проводили після введення препарату тричі з проміжками в 1 год. Досліджуваний розчин ЛПС вважали непірогенним,

якщо сума підвищень температур у 3 кролів була меншою або дорівнювала 1,4°C. Якщо ця сума перевищувала 2,2°C, то досліджуваний розчин вважали пірогенним. Експеримент проводили в трьох повторностях.

#### Результати та обговорення

Відомо, що ЛПС грамнегативних бактерій характеризуються високою імунологічною, радіопротекторною та протипухлинною активністю, що дозволяє розглядати їх як основу для потенційних лікувальних і профілактичних препаратів. Основною перешкодою для такого застосування ЛПС слугує їх висока токсичність та пірогенність. Оскільки *P. fontium* є представником нового, ще не вивченого роду *Enterobacteriaceae*, дослідження токсичності і пірогенності їх ЛПС, а також жирнокислотного складу ліпідів А дадуть змогу зробити внесок в біологічну характеристику представників цього виду.

Для оцінки токсичності ЛПС досліджуваних штамів *P. fontium* визначали дозу препарату ЛПС, яка при внутрішньоочеревинному введенні галактозамінгидрохлорид-сенсифілізованим мишам викликала загибель 50% експериментальних тварин (ЛД<sub>50</sub>). Досліджувані препарати

ЛПС проявляли різний рівень токсичної активності, що відображено в показниках ЛД<sub>50</sub> (табл. 1). При аналізі отриманих результатів можна відмітити, що ЛПС шт. 27480 характеризувався найбільшою токсичністю, ЛД<sub>50</sub> якого складала 1875 мг/кг, найменш токсичний - ЛПС шт. 28652, ЛД<sub>50</sub> якого - 4412 мг/кг. Треба відмітити, що отримані результати вказують на відносну нетоксичність ЛПС *P. fontium* в порівнянні з іншими представниками родини *Enterobacteriaceae*, зокрема *E. coli* O55:B5, який був використаний для порівняння.

Вивчення пірогенної дії ЛПС проводили згідно біологічного методу якісного контролю присутності бактеріальних ендотоксинів в медичних препаратах. Для проведення порівняльної оцінки пірогенних характеристик досліджуваних ЛПС при внутрішньовенному введенні кролям в серії розведень була встановлена мінімальна пірогенна доза, яка складала  $7,5 \times 10^{-3}$  мкг ЛПС/мл апірогенного ізотонічного розчину. Результати термометрії (рисунок, табл. 2) показали, що підвищення температури у експериментальних тварин більш, ніж на 0,45°C, що ви-

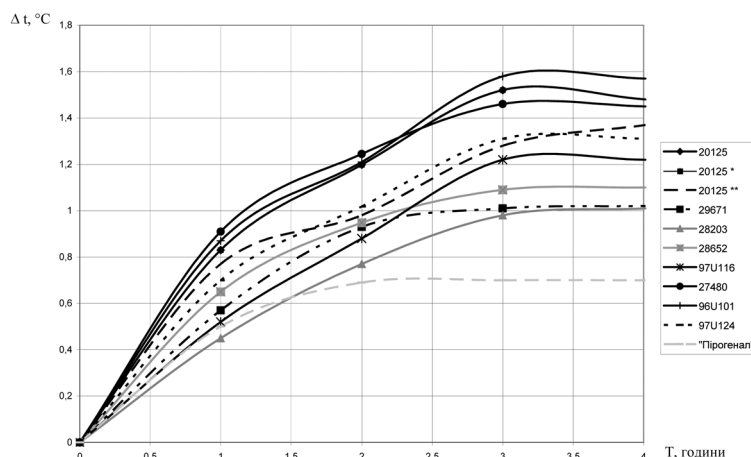


Рисунок. Пірогенна дія ЛПС *P. fontium*

20125\* — ЛПС, одержаний при вирощуванні культури при 4°C;  
20125\*\* — ЛПС, одержаний при вирощуванні культури при 36°C;  
всі інші — ЛПС, одержані при вирощуванні культур при 25°C

Таблиця 1  
Визначення ЛД<sub>50</sub> ЛПС *P. fontium*

| ЛПС штамів                | ЛД <sub>50</sub> |        |
|---------------------------|------------------|--------|
|                           | мкг/мишу         | мкг/кг |
| 20125                     | 40               | 2857   |
| 20125*                    | 30               | 2143   |
| 20125**                   | 60               | 3529   |
| 29671                     | 50               | 3333   |
| 28203                     | 40               | 2857   |
| 28652                     | 75               | 4412   |
| 97U116                    | 50               | 3333   |
| 27480                     | 30               | 1875   |
| 96U101                    | 40               | 2667   |
| 97U124                    | 50               | 3333   |
| ЛПС <i>E. coli</i> O55:B5 | 0,14             | 8      |

Примітки: в цій та табл. 2 і 3 1.\* — ЛПС, одержаний при вирощуванні культури при 4°C; 2.\*\* — ЛПС, одержаний при вирощуванні культури при 36°C; 3. всі інші - ЛПС, одержані при вирощуванні культур при 25°C.

Таблиця 2  
Визначення пірогенної дії ЛПС *P. fontium*

| Штами                                 | Середнє значення відхилення температури (°C) після введення через різні проміжки часу |        |       |
|---------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|--------|-------|
|                                       | 1 год                                                                                 | 2 год  | 3 год |
| 20125                                 | +0,83                                                                                 | +1,198 | +1,52 |
| 20125*                                | +1,01                                                                                 | +1,31  | +1,64 |
| 20125**                               | +0,77                                                                                 | +0,98  | +1,28 |
| 29671                                 | +0,57                                                                                 | +0,93  | +1,01 |
| 28203                                 | +0,45                                                                                 | +0,77  | +0,98 |
| 28652                                 | +0,65                                                                                 | +0,948 | +1,09 |
| 97U116                                | +0,52                                                                                 | +0,88  | +1,22 |
| 27480                                 | +0,91                                                                                 | +1,245 | +1,46 |
| 96U101                                | +0,87                                                                                 | +1,21  | +1,58 |
| 97U124                                | +0,7                                                                                  | +1,018 | +1,31 |
| ЛПС <i>Shigella typhi</i> "Пірогенал" | +0,59                                                                                 | +0,69  | +0,71 |

ходить за межі фізіологічної норми здорових тварин, викликали розчини ЛПС всіх досліджуваних штамів, введення яких протягом перших 2 год приводило до різкого підвищення температури тіла. Як свідчать результати, ЛПС всіх досліджуваних штамів *P. fontium* виявляли значно більшу пірогенну активність ніж "Пірогенал" - фармацевтичний препарат, діючим компонентом якого є ЛПС *Shigella typhi*.

Оскільки досліджувані ЛПС розрізнялися між собою як токсичністю, так і пірогенністю, ймовірно, вони характеризуються деякими особливостями хімічного складу ліпідів А, зокрема вмістом жирних кислот. На основі даних хромато-мас-спектрометрії з використанням метода комп'ютерного аналізу (табл. 3) в ліпідах А всіх

ти. Ненасичені жирні кислоти не є характерними компонентами ліпиду А, а є результатом деградації оксикислот, хоч в літературі описані деякі випадки виявлення їх в складі ліпиду А [8]. Своєрідність жирнокислотного складу ліпиду А, найбільш консервативної частини молекули ЛПС, може бути використана також як додатковий таксономічний критерій при диференціації видів. І дійсно, як і для інших представників *Enterobacteriaceae*, для ліпиду А *P. fontium* характерна присутність тільки однієї гідроксикислоти - 3-гідрокситетрадеканової, яка ацилює як аміно-, так і гідроксильні групи глюкозаміну. Отже отримані дані є додатковим показником, який підтверджує правильність віднесення досліджуваних штамів до представників ентеробактерій.

Таблиця 3

**Жирнокислотний склад ЛПС *P. fontium***

| Штам, препарат | Вміст жирних кислот, % до загальної суми площ піків |                |                          |                |                |                    |
|----------------|-----------------------------------------------------|----------------|--------------------------|----------------|----------------|--------------------|
|                | до-деканова                                         | тетра-деканова | 3-гідрокситетра-деканова | гекса-деканова | гекса-деканова | мінорні компоненти |
| 20125          | 1,6                                                 | 19,7           | 47,3                     | 16,9           | 12,1           | 2,4                |
| 20125*         | 0,8                                                 | 20,3           | 45,9                     | 24,1           | 8,9            | 0                  |
| 20125**        | 7,1                                                 | 29,5           | 39,9                     | 8,2            | 11,3           | 4,0                |
| 29671          | 1,5                                                 | 20,7           | 49,6                     | 17,9           | 7,7            | 2,6                |
| 28203          | 1,5                                                 | 23,6           | 48,7                     | 17,6           | 7,3            | 1,3                |
| 28652          | 2,2                                                 | 23,5           | 42,1                     | 13,4           | 15,4           | 3,4                |
| 97U116         | 4,9                                                 | 23,5           | 45,8                     | 8,6            | 12,6           | 4,6                |
| 27480          | 4,2                                                 | 28,9           | 45,1                     | 7,5            | 7,9            | 6,4                |
| 96U101         | 4,3                                                 | 24,5           | 47,8                     | 8,7            | 10,8           | 4,0                |
| 97U124         | 3,9                                                 | 22,5           | 44,7                     | 13,2           | 11,5           | 4,2                |

досліджуваних штамів *P. fontium* ідентифіковані жирні кислоти, які містять в ланцюгу від 12 до 16 атомів вуглецю. Домінуючою в ліпідах А всіх досліджених штамів була 3-гідрокситетрадеканова кислота, яка виявлялася від 42% до 49 % в залежності від штаму. Також виявлені тетрадеканова, гексадеканова, гексадеканова та додеканова жирні кисло-

Таким чином, наявність 3-гідрокситетрадеканової кислоти є характерною для всієї родини *Enterobacteriaceae*, хоча наявність певних оксикислот в ліпіді А для більшості грамнегативних бактерій є видовою ознакою [9, 10].

За жирнокислотним складом ліпіди А всіх досліджуваних штамів можна віднести до одного хемотипу.

Порівняльне вивчення токсичності і пірогенності ЛПС досліджуваних штамів *P. fontium* з жирнокислотним складом свідчить про різницю в якісному складі. Зокрема, ЛПС, які більш ендотоксичні, містять в 2 рази меншу кількість гексадеканової і гексадеканової кислот.

Фактором, який кардинально змінює у бактерій експресію ряду ознак, є температура інкубації. Хоча температурнозалежні зміни носять регуляторний характер, вони відображаються на синтезі конститутивних біополімерів клітини і, зокрема, на хімічній структурі ЛПС, що, в свою чергу, впливає на його ендотоксичні властивості. Вивчення жирнокислотного складу ліпиду А ЛПС типового штаму 20125, який вирощували при 4, 25 і 36°C свідчить, що якісних змін в них не спостерігається, але виявлено зміни в кількісному складі. Так, з підвищенням температури збільшувався вміст насичених жирних кислот - додеканової, тетрадеканової, гексадеканової та, відповідно, зменшувалась кількість ненасиченої жирної кислоти - гексадеканової (табл. 3). При дослідженні ендотоксичних властивостей встановлено (табл. 1, 2), що ЛПС, виділені з клітин *P. fontium*, які вирощували при низькій температурі (4°C), були більш токсичні і пірогенні, ніж ЛПС, одержані з клітин, вирощування яких проводили при більш високих (36 °C) в порівнянні із звичайними (25°C) температурами. Аналогічні результати були одержані раніше дослідниками [11], які показали, що ЛПС, виділений із *Yersinia pestis* EV 76, яка вирощена при 28 °C, проявляє токсичність щодо білих мишей в дозах 300-1000 мкг. Препарати ЛПС, одержані шляхом вирощування бактерій при температурі 37 °C, були нетоксичними при внутрішньоочеревинному введенні 3000 мкг.

Таким чином, нами вперше показано, що, на відміну від ЛПС інших представників ентеробактерій, ЛПС *P. fontium* менш токсичні і пірогенні. Встановлена різниця в якісному жирнокислотному складі більш і менш токсичних і пірогенних ЛПС. ЛПС, одержані з клітин *P. fontium*, вирощених при більш низькій температурі, проявляли більшу токсичність і пірогенність.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Izard D., Gavini F., Frinel P., Leclerc H. *Rahnella aquatilis*, nouveau membre de la famille des Enterobacteriaceae //Ann. Microbiol. Inst. Pasteur. — 1979. — V. 130. — A. 163–167.
2. Aldova E., Hausner O., Brenner J. *Pragia fontium* gen. nov., sp. nov. of the family Enterobacteriaceae, isolated from water//Int. J. System. Bacteriol. — 1988. -V.38. — P.183–189.
3. Варбанец Л.Д., Шубчинский В.В., Похил С.И. Характеристика эндотоксического липополисахарида *Pragia fontium* DRL 27480 //Совр. пробл. токсикол. — 2006. — №.2 — С. 66–71.
4. Vidaver A. Synthetic and complex media for the rapid detection of fluorescence of phytopathogenic pseudomonas: effect of the carbon source //Appl. Microbiol. — 1967. — V. 15, №16. — P. 1523–1524.
5. Westphal O. and Jann K. Bacterial lipopolysaccharides extraction with phenol-water and further application of the procedure / In: Methods in Carbohydrate Chemistry (Whistler R.L., Wolfrom M.L., Eds.). — New York: Academic Press. — 1965. — V. 5. — P. 83–91.
6. Albershein P., Nevis D.J., English P.D., Karr A. A method for analysis of sugars in plant cell wall polysaccharides by gasliquid chromatography // Carboh. Res. — 1976. — V. 5, №3. — P. 340–345.
7. Варбанец Л.Д., Здоровенко Г.М., Книрель Ю.А. Методы исследования эндотоксинов. — К.: Наукова думка, 2006. — 237 с.
8. Akiyama Y., Nishikawaji S., Eda S. et al. Lipopolysaccharide of *Pseudomonas solanacearum* //Agric. Biol. Chem. — 1985. — V. 49, №4. — P. 1193–1194.
9. Takayama K., Qureshi N. Chemical structure of lipid A. / In: Morison D.C., Ryan J.L.(Eds.): Bacterial endotoxic lipopolysaccharides. — 1992. — № 1. — P. 43–60.
10. Stead D.E. Grouping of plant-pathogenic and some other Pseudomonas spp. by using cellular fatty acid profiles//Intern. J. Syst. Bacteriol. — 1992. -V. 42, N2. — P. 281–295.
11. Тынянова В.И., Зюзина В.П., Демидова Г.М. и др. Токсичность препаратов липополисахаридов из культуры *Yersinia pestis* EV 76, выращенной при 28 и 37 °С //Биотехнология. — 2003. — №6. — С. 10–16.

*В.В. Шубчинский, Л.Д. Варбанец, О.С. Броварская*

### ЭНДОТОКСИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ЛИПОПОЛИСАХАРИДОВ *PRAGIA FONTIUM*

Впервые показано, что, в отличие от липополисахаридов других представителей энтеробактерий, ЛПС *P. fontium* менее токсичны и пирогенны. Установлена разница в количественном жирнокислотном составе более и менее токсичных и пирогенных ЛПС. ЛПС, полученные с клеток *P. fontium*, выращенных при более низкой температуре, проявляли большую токсичность и пирогенность.

*V.V. Shubshinskyi, L.D. Varbanets, O.S. Brovarkaya*

### ENDOTOXIC ACTIVITY OF *PRAGIA FONTIUM* LIPOPOLYSACCHARIDES

For the first time it was shown that unlike of lipopolysaccharides of other representatives of enterobacteria, LPS of *P. fontium* are less toxic and pyrogenic. The differences in quantitative fatty acid composition of more and less toxic and pyrogenic LPS have been established. It was settled that LPS obtained from *P. fontium* cells which was grown at more low temperature displayed more high toxicity and pyrogenicity.