

Міністерство освіти і науки України
Національний університет «Києво-Могилянська академія»

Факультет природничих наук

Кафедра біології

Кваліфікаційна робота
освітній ступінь - бакалавр

на тему «**ОДЕРЖАННЯ ТА ХАРАКТЕРИСТИКА
ЛІПОПОЛІСАХАРИДУ ШТАМУ *PSEUDOMONAS MANDELI* U1»**

Виконала: студентка 4-го року навчання
спеціальності 091 — біологія
Герман Анастасія Дмитрівна

Керівники
Броварська О.С.,
кандидат біологічних наук, старший
науковий співробітник Інституту
мікробіології та вірусології ім. Д.К.
Заболотного НАН України;

Фуртат І.М.,
кандидат біологічних наук, доцент
кафедри біології НаУКМА

Рецензент Буценко Л.М.,
кандидат біологічних наук, старший
науковий співробітник

Кваліфікаційну роботу захищено
з оцінкою _____

Секретар ЕК
Пасічник Т.В.
«_____» червня 20__ року

ЗМІСТ

	Стор.
ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ _____	4
ВСТУП _____	5
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ _____	8
1.1. Загальна характеристика виду <i>Pseudomonas mandelii</i> _____	8
1.1.1. Систематика та філогенія виду <i>Pseudomonas mandelii</i> _____	8
1.1.2. Культурально-морфологічні, фізіолого-біохімічні та молекулярно-генетичні особливості представників виду <i>Pseudomonas mandelii</i> _____	8
1.1.3. Особливості метаболізму представників виду <i>P. mandelii</i> _____	11
1.2. Структурна характеристика ліпополісахаридів представників роду <i>Pseudomonas</i> _____	13
1.2.1. Будова та структурна організація ліпиду А _____	14
1.2.2. Будова та структура корової частини ЛПС _____	17
1.2.3. Будова та структура О-специфічних ланцюгів ЛПС псевдомонасів _____	20
1.3. Біологічна активність ліпополісахаридів грамнегативних бактерій _____	22
1.3.1. Антигенні властивості ліпополісахаридів _____	22
1.3.2. Механізм розпізнавання ЛПС грамнегативних бактерій імунною системою організму хазяїна _____	23
ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА _____	27
РОЗДІЛ 2. ОБ'ЄКТИ, МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ _____	27
2.1. Характеристика штаму, використаного у дослідженні та умови культивування _____	27
2.2. Реактиви, розчини та середовище культивування, які було	27

використано у роботі_____	
2.3. Отримання та характеристика ЛПС штаму <i>P. mandelii</i> U1_____	28
2.3.1. Виділення та визначення чистоти препаратів ЛПС_____	28
2.3.2. Визначення хімічного складу препаратів ЛПС_____	29
2.4. Визначення біологічної активності ЛПС штаму <i>P. mandelii</i> U1_____	31
2.4.1. Встановлення пірогенності отриманих препаратів ЛПС_____	31
2.4.2. Отримання антисироватки, специфічної до корпускулярного антигену штаму <i>P. mandelii</i> U1, та визначення антигенної активності препаратів ЛПС_____	32
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХНЕ ОБГОВОРЕННЯ_____	34
3.1. Дослідження складу препаратів ЛПС штаму <i>Pseudomonas mandelii</i> U1_____	34
3.1.1. Характеристика препаратів ліпополісахариду, отриманих водно-фенольним методом Вестфалю та Янна_____	34
3.1.2. Вивчення хімічного складу препаратів ЛПС_____	37
3.2. Дослідження біологічної активності препаратів ЛПС штаму <i>P. mandelii</i> U1_____	43
3.2.1. Вивчення пірогенної дії препаратів ЛПС <i>P. mandelii</i> U1_____	43
3.2.2. Вивчення імуногенної активності препаратів ЛПС штаму <i>P. mandelii</i> U1 за допомогою отриманої поліклональної антисироватки, специфічної до корпускулярного антигену_____	45
УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ_____	47
ВИСНОВКИ_____	50
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ_____	51

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

КДО	- 2-кето-3-дезоксиктонова кислота
ЛПБ	- ліпополісахарид-зв'язувальний білок
ЛПС	- ліпополісахарид
МПА	- м'ясо-пептонний агар
CD14	- кластер диференціювання (<u>c</u> luster of <u>d</u> ifferentiation 14)
Нер	- гептоза
IRAK	- інтерлейкін-1 рецептор-асоційована кінза (<u>i</u> nterleukin-1 <u>r</u> ecceptor- <u>a</u> ssociated <u>k</u> inase)
MD-2	- мієлоїдний фактор диференціювання 2 (<u>m</u> yeloid <u>d</u> ifferentiation <u>2</u>)
MyD88	- мієлоїдний фактор диференціювання первинної відповіді 88 (<u>M</u> yeloid <u>d</u> ifferentiation primary response <u>88</u>)
TAB1	- TAK1 асоційований зв'язувальний протеїн 1 (<u>T</u> AK1- <u>a</u> ssociated <u>b</u> inding protein <u>1</u>)
TAK1	- TGF- β активована кінза 1 (<u>T</u> GF- β <u>a</u> ctivated <u>k</u> inase 1)
TIRAP	- адаптерний білок Толл-інтерлейкін 1 рецепторного домена (<u>T</u> oll/ <u>i</u> nterleukin 1 <u>r</u> ecceptor domain containing <u>a</u> dapter <u>p</u> rotein)
TLR	- Toll-подібний рецептор (<u>T</u> oll- <u>l</u> ike <u>r</u> ecceptor)
TRAF6	- фактор 6, що асоційований з рецептором фактора некрозу пухлин (<u>T</u> NF <u>r</u> ecceptor- <u>a</u> ssociated <u>f</u> actor <u>6</u>)
<i>P.</i>	- <i>Pseudomonas</i>

ВСТУП

Ліпополісахарид – це інтегральний компонент зовнішньої мембрани грамнегативних бактерій, що є унікальним біополімером цих мікроорганізмів, оскільки згадана структура наявна лише у цієї фізіологічної групи. ЛПС складається з трьох основних частин, кожна з яких забезпечує токсичні властивості цієї макромолекули. Функціонально ЛПС є ендотоксином, дія якого не залежить від таксономічного положення мікроорганізмів. З огляду на це, активно досліджується архітектоніка ЛПС різних видів грамнегативних бактерій, в тому числі й представників роду *Pseudomonas*. Нині детально описано хімічний склад та біологічну активність ЛПС виду *P. aeruginosa* [1], оскільки ці бактерії належать до умовно-патогенних, серед яких нараховується значна кількість штамів, що викликають захворювання у ссавців. Разом із тим науковий інтерес викликають також і фітопатогенні представники цього роду, як наприклад *P. wieringae*, *P. chlororapsis*, ЛПС яких є вивченим недостатньо [2,3]. Дослідження ЛПС фітопатогенних бактерій розширить вже наявну інформацію та дозволить з'ясувати роль цього інтегрального компонента клітинної стінки грамнегативних бактерій у розвитку інфекційних захворювань рослин. Порівняно зі згаданими вище представниками роду *Pseudomonas*, хімічний склад та структурна організація ЛПС виду *P. mandelii* остаточно не з'ясована. Нині встановлено лише архітектоніку О-специфічного ланцюга ліпополісахариду штаму *P. mandelii* CYar1 [4].

Дані щодо моносахаридного складу О-антигену ЛПС грамнегативних бактерій враховуються під час отримання специфічних імунних сироваток. Останні взаємодіють з О-ланцюгами певної довжини та вуглеводного складу, які можуть варіювати у різних штамів, та утворювати специфічний комплекс антиген-антитіло. У подальшому ці результати можуть бути використані для серотипування грамнегативних бактерій. Також відомості щодо складу О-специфічного полісахариду уможливають з'ясування особливостей процесу

адаптації грамнегативних бактерій до різних умов існування, зокрема хімічних та фізичних стресів. До таких чинників насамперед належать зміни температур, концентрації кисню, рН, а також вплив антимікробних препаратів [5]. Тому, дослідження хімічного складу ЛПС психрофільних представників роду *Pseudomonas* викликають особливий інтерес, оскільки накопичення результатів експериментальних досліджень надалі дозволить з'ясувати особливості їхнього пристосування до виживання за екстремальних умов. З огляду на викладене вище, існує необхідність у розширенні експериментальних даних стосовно холодостійкої біоти Антарктиди, хімічний склад та біологічну активність ЛПС бактерій, що її населяють, на прикладі штаму *P. mandelii* U1.

Також, вивчення імунобіологічних властивостей окремих компонентів ЛПС стає можливим після з'ясування складу та взаємодії структур. Відомо, що ця здатність посилюється за наявності залишків 2-кето-3-дезоксиктонової кислоти та гептоз, які топологічно виходять за межі сайту зв'язування з мієлоїдним фактором диференціювання MD-2 [6]. Така конфігурація комплексу ліганд-рецептор забезпечує можливість обертання ядра олігосахариду, тим самим впливаючи на специфічне зв'язування з Toll-подібними рецепторами 4 (TLR4). Ця взаємодія у подальшому є сигналом для MAP-кіназного та NF-κB сигнальних шляхів, які активуються у відповідь [1,6,7]. Як наслідок, їхнє функціонування впливатиме на рівень імунного захисту і нейтралізацію патогенних мікроорганізмів. Також перспективним та наразі не дослідженим напрямком є з'ясування впливу КДО і гептоз на взаємодію з ліпополісахарид-зв'язувальним білком та CD14 [6].

З'ясування жирнокислотного складу ЛПС грамнегативних бактерій необхідне для подальшого використання як діагностично-диференційну ознаку, що є корисною для розподілу видів у межах роду, оскільки кожен вид характеризується унікальним набором жирних кислот. Зокрема, штами *P. aeruginosa* мають більш короткі жирні кислоти з кількістю карбонів 10 – 12, порівняно з 14 атомами у ентеробактерій [8]. Саме довжина жирних

кислот впливає на рівень токсичності ЛПС. Було показано, що ліпополісахарид *P. aeruginosa* є менш токсичним для піддослідних тварин, порівняно з ентеробактеріями [8]. Зокрема, детальна характеристика жирнокислотного складу непатогенних, умовно-патогенних та патогенних видів дозволяє синтезувати модифіковані ліпополісахариди, на підставі яких створюються сучасні терапевтичні засоби.

З огляду на вищевикладене, метою роботи було дослідити особливості хімічного складу та імунобіологічної активності ЛПС штаму *P. mandelii* U1 антарктичного походження.

Для цього необхідно було вирішити такі завдання:

- 1) виділити, очистити та охарактеризувати хімічний склад отриманих препаратів ЛПС штаму *P. mandelii* U1, який було ізольовано зі зразків антарктичного моху на острові Галіндез;
- 2) визначити жирнокислотний склад ліпиду А в препаратах ЛПС *P. mandelii*;
- 3) з'ясувати моносахаридний склад препаратів ЛПС *P. mandelii* U1;
- 4) встановити пірогенність препаратів ЛПС дослідного штаму;
- 5) отримати поліклональну кролячу сироватку, специфічну до корпускулярного антигену штаму *P. mandelii* U1;
- 6) охарактеризувати імунобіологічну активність отриманих препаратів ЛПС штаму *P. mandelii* U1 за допомогою поліклональної кролячої антисироватки.

Експериментальну частину роботи було виконано у відділі біохімії мікроорганізмів Інституту мікробіології та вірусології ім. Д. К. Заболотного НАН України, під керівництвом к.б.н., старшого наукового співробітника Броварської О.С., керівник від кафедри – к.б.н., доцент Фуртат І.М.

РОЗДІЛ 1

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Загальна характеристика виду *Pseudomonas mandelii*

1.1.1. Систематика та філогенія виду *Pseudomonas mandelii*. Вперше, *Pseudomonas mandelii* було виділено з мінеральних вод Франції у 1995 році та класифіковано у 1999 році [9,10]. За систематичним положенням ці бактерії належать до роду *Pseudomonas*, групи *Pseudomonas fluorescens*, куди їх було віднесено на підставі результатів конкатенування послідовностей 16S рРНК, ДНК-гірази підтипу Б (*gyrB*), сігма фактора Д РНК-полімерази (*rpoD*), підтипу β РНК-полімерази (*rpoB*) [9,11–13]. Створення філогенетичного дерева, яке базується на підставі аналізу послідовностей гена 16S РНК (*rrs*) є недоцільним, оскільки лінії бактерій не відрізнялись у жодному з побудованих дерев. З огляду на це, окрім послідовностей гена 16S РНК (*rrs*) також застосовують чотири послідовності генів, які використовуються у біоінформаційному мультилокусному аналізі послідовностей (Multilocus sequence analysis, MLSA). Останній здебільшого використовується для створення філогенетичного дерева представників роду *Pseudomonas* [11,13]. Для побудови філогенетичного дерева використовували результати секвенування геномів 127 типових штамів, віднесених до групи *Pseudomonas fluorescens* (рис. 1.1).

Таким чином, вид *Pseudomonas mandelii* є філогенетично близькоспорідненим до виду *Pseudomonas fluorescens* і входить до цієї групи.

1.1.2. Культурально-морфологічні, фізіолого-біохімічні та молекулярно-генетичні особливості представників виду *Pseudomonas mandelii*. Представники виду *P. mandelii* – це грамнегативні паличкоподібні бактерії, здатні до руху за рахунок одного полярного джгутика (рис. 1.2), що не утворюють спор [9]. При культивуванні на м'ясо-пептонному агарі формують гладкі, круглі, непігментовані колонії [9].

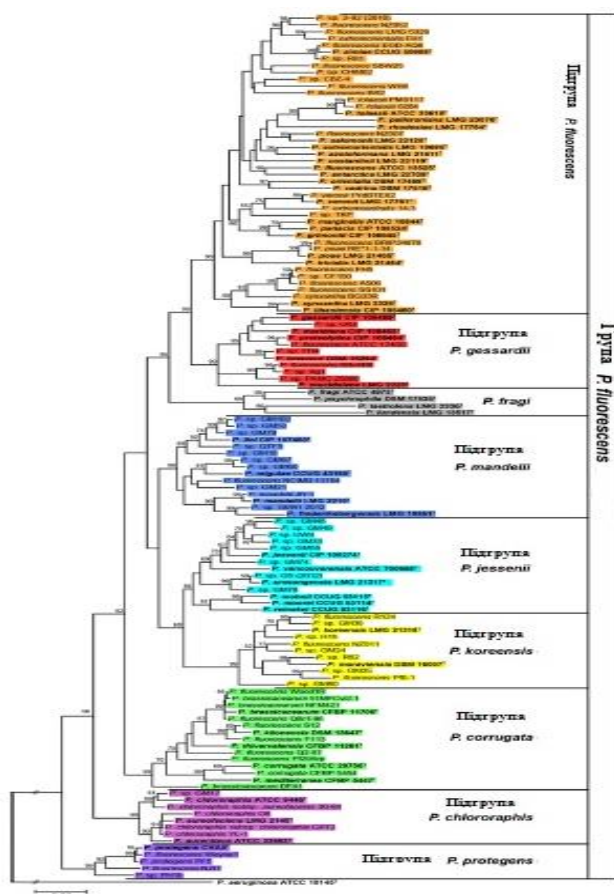


Рис. 1.1. Філогенетичне дерево групи *Pseudomonas fluorescens* [адаптовано 11].

Представники виду *P. mandelii* є каталазо- та оксидазопозитивними [9]. Типовий штам *P. mandelii* CIP 105273 не виявляє желатиназної, коагулазної, дезоксирибонуклеазної, лецитиназної, фібринолітичної, гемолітичної активності [9]. Це може свідчити про те, що виду *P. mandelii* CIP 105273 не притаманні патогенні властивості. Втім клінічне значення нині остаточно не з'ясовано.

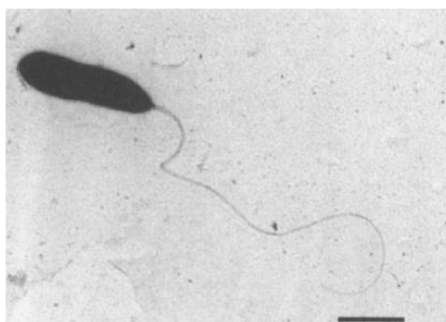


Рис. 1.2. Електронна мікрофотографія клітини бактерії виду *Pseudomonas mandelii* [9].

Штами виду *P. mandelii* засвоюють значну кількість різноманітних вуглеводів, α -D-глюкозу, D-фруктозу, D-галактозу, трегалозу, D-манозу, D-рибозу, D-ксилозу та інші сполуки, як гліцерин, малонат, D-маніт, D-сорбітол, цис-аконітат, цитрат, N-ацетил-D-глюкозамін, бензоат, бетаїн, сукцинат та фумарат [9].

Представники виду *P. mandelii* є факультативними анаеробами, хемоорганотрофами. Ці бактерії відносяться до психрофілів, тобто здатні існувати і розмножуватися в місцях, де постійно низька температура. Мінімальна температура, за якої *P. mandelii* можуть рости, становить 4 °C, максимальна – 37 °C [14]. Оптимальною для росту є 25 °C [14]. Тобто виходячи з температурних меж – вони є факультативними психрофілами. Ці бактерії також здатні рости за низьких концентрацій солей (0,08 %), але за високих концентрацій NaCl (5 та 7 %) не ростуть [9]. Саме тому, більшу частину штамів було виділено на територіях з холодним кліматом – в Антарктиці, що є однією з найбільш екстремальних частин на планеті. Окрім холодного клімату, особливими є: низька доступність поживних субстратів, сильні вітри, періоди високої сонячної радіації та довготривалі періоди повної темноти [15].

Особливістю представників цього виду є естеразна активність [16]. Естерази розщеплюють здебільшого складні ефіри жирних кислот з коротким ланцюгом [16]. Структурно ліполітичні ферменти складаються з односторонньої молекули і належать до суперродини α/β -гідролаз [16]. За рахунок активного сайту, який містить каталітичну трійцю з залишків серину, гістидину та аспартату, ферменти адаптовані до холодних умов і найактивніше діють саме за низьких температур.

Представники виду *P. mandelii* здатні утворювати біоплівки на різних поверхнях. Формування біоплівок внаслідок синтезу альгінату клітинами цих бактерій відбувається активніше за температури 4 і 15 °C (6 та 3 рази, відповідно), порівняно з 25 °C. Тобто ця здатність вища за мінімальних температур росту (4 °C), що відрізняється від температури цього процесу у

Pseudomonas fluorescens, продуктивність яких найвища за оптимальної температури 25°C [15].

Антарктичний штам *P. mandelii* 6A1 характеризується підвищеною стійкістю до антибіотиків. Клітини цього штаму є резистентними до амоксициліну, цефотоксину і еритроміцину [15]. Резистентність до цефтазидиму, що є антибіотиком цефалоспоринового ряду третього покоління, у штама *P. mandelii* 6A1 є в чотири рази вищою, ніж у штамів *P. aeruginosa* [15]. Високу резистентність ці бактерії виявляють щодо іміпенему, дорипенему, ертапенему, які належать до родини β -лактамних карбапенемних антибіотиків [15].

Наразі наявні дані лише попереднього секвенування геному *P. mandelii* [14,17]. Відповідно до яких, його розміри складають близько 7,1 Мб. І він нараховує 6374 гени, що кодують білки. Середній вміст ГЦ пар у геномі становить 59 % [17].

Таким чином, описане вище свідчить, що вид *P. mandelii* відрізняється від представників роду *Pseudomonas*, насамперед температурними межами росту та підвищеною стійкістю до антибіотиків.

1.1.3. Особливості метаболізму представників виду *P. mandelii*. За анаеробних умов, бактерії цього виду здатні гідролізувати аргінін, але не здатні декарбоксилювати лізин та орнітин [9]. Здатність до гідролізу певних амінокислот відрізняється у різних штамів в межах виду. Так, наприклад, штам 6A1, що було виділено з морських покладів біля острова Кінг-Джордж в Антарктиці, здатен до утилізації фенілаланіну, триптофану, малату та L-гістидину, на відміну від близькоспорідненого штаму CIP 105273, який такими властивостями не володіє [15].

Описана вище здатність (п. 1.1.2.) вказує на різноманітність метаболічних шляхів представників виду *P. mandelii*. Зокрема, у цих бактерій функціонує цикл трикарбонових кислот, гліколітичний шлях, пентозофосфатний цикл, причому як окисні стадії, так і неокиснювальні, а також шлях Ентнера-Дудорова.

Щодо метаболізму амінокислот, то штами *P. mandelii* здатні до біосинтезу проліну з глутамату, валіну та ізолейцину з пірувату, цистеїну з серину [18]. Окрім того, вони синтезують такі вітаміни, як рибофлавін, вітамін В6, біотин та фолієву кислоту [18].

Ще однією особливістю метаболізму *P. mandelii* є здатність до нітрифікації [19,20]. Саме тому, ці бактерії населяють не лише мінеральні води та території з холодним кліматом, а також ґрунти сільськогосподарського призначення, насамперед картопляні поля, де вони домінують серед денітрифікувальних мікроорганізмів [16,19,20].

Іншою особливістю представників виду *P. mandelii* є здатність до синтезу альгінату [15,21]. Альгінат – це лінійний полісахарид, що складається з β -D-мануронової та α -L-гулууронової кислот, є важливим компонентом позаклітинних полісахаридів у всіх псевдомонад [21]. У свою чергу, екзополісахариди утворюють структуру позаклітинного матриксу біоплівки. У довкіллі бактерії використовують ці речовини для пристосування до суворих кліматичних умов. Тому, кількість синтезованого альгінату *P. mandelii* буде залежати від коливання температури середовища, оскільки цей полісахарид захищає клітини від чинників довкілля [15].

Таким чином, представники виду *P. mandelii* є перспективним об'єктом, на якому досліджуються не встановлені нині діагностично значимі ознаки. Наприклад, склад та структура ліпополісахаридів, хімічний склад клітини, тощо. Окрім того, не з'ясованим залишаються патогенні та вірулентні властивості, а також структура геному бактерій цього виду.

1.2. Структурна характеристика ліпополісахаридів представників роду *Pseudomonas*

Особливістю структурної організації клітинної стінки грамнегативних бактерій є наявність зовнішньої мембрани, якій притаманна асиметричність [2,5]. Зовнішня мембрана складається з кількох шарів. Зовнішній шар представлений ліпополісахаридами та внутрішній – гліцерофосфоліпідами (рис. 1.3).

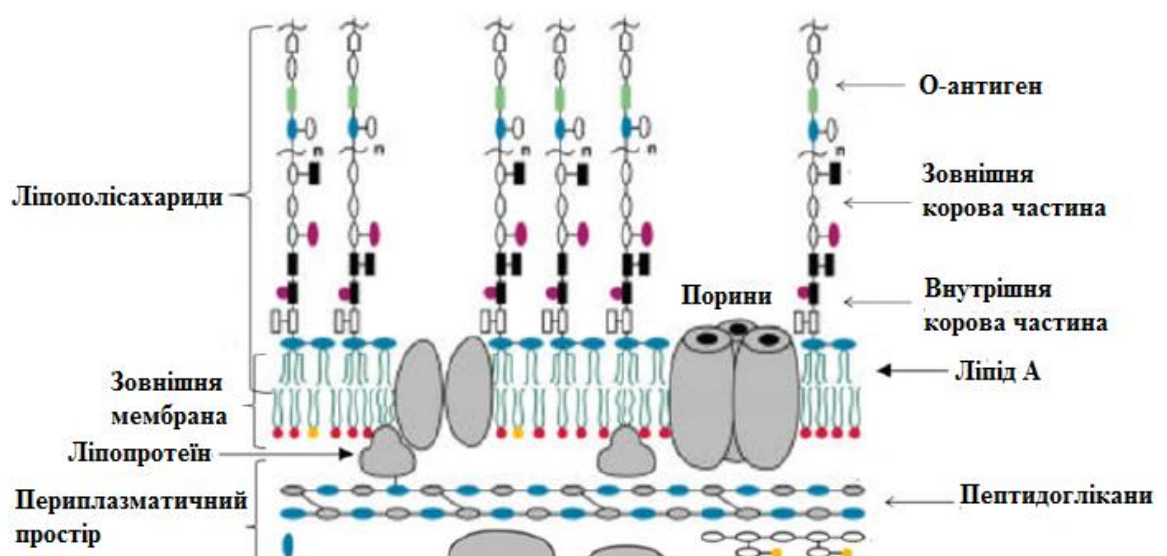


Рис. 1.3. Схема будови зовнішньої мембрани грамнегативних бактерій [адаптовано 5].

В зовнішню мембрану можуть бути інтегровані білки, наприклад, порини, що забезпечують надходження в клітину невеликих за розміром гідрофільних молекул. Також внутрішня частина зовнішньої мембрани може містити ліпопротеїди (див. рис. 1.3). Між зовнішньою та цитоплазматичною мембранами розташований периплазматичний простір, що характеризується наявністю пептидогліканового шару, який є основним структурним компонентом клітинної стінки. На підставі структурної організації та складу, ліпополісахариди розподіляють на S-ЛПС, у складі якого наявний ліпід А, кор та O-специфічний ланцюг. На відмінну від зазначеного вище, R-ЛПС містить ліпід А, кор, та не містить O-специфічного ланцюга (рис. 1.4). Так,

наприклад, ЛПС у представників родин *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonadaceae*, *Pasteurellaceae* та *Vibrionaceae* містять усі три структурні компоненти і називаються S-ЛПС [5].

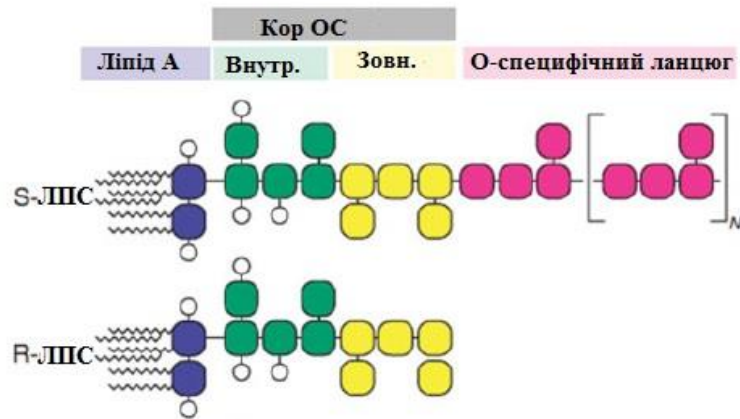


Рис. 1.4. Схема будови структурних компонентів S-ЛПС та R-ЛПС [адаптовано 5].

1.2.1. Будова та структурна організація ліпиду А. Ліпід А є ліпофільною, а отже і гідрофобною, частиною молекули ЛПС. Він закріплюється у зовнішній мембрані грамнегативних бактерій через ліпід А, за рахунок іонних та гідрофобних взаємодій між фосфоліпідами внутрішнього шару зовнішньої мембрани та жирними кислотами ліпиду А. Останній у представників виду *Pseudomonas aeruginosa* [8,22] складається з дисахаридної основи, що представлена двома глюкозамінами, які з'єднані між собою через β -1,6-глікозидний зв'язок (рис. 1.5). Кожен глюкозамін містить один фосфорний залишок. У першому сахариді, він розташований біля першого атому карбону, а у другому – біля четвертого атому С. Обидва глюкозаміни ацильовані жирними кислотами у положеннях 2 та 3.

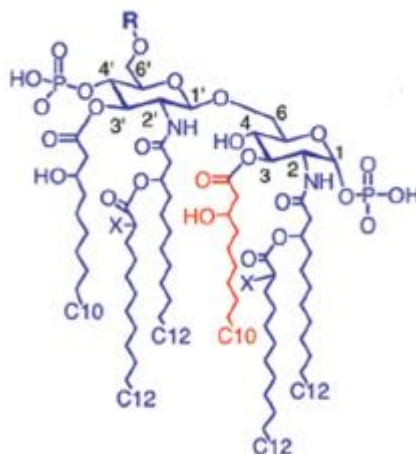


Рис. 1.5. Структурна організація гексаацильованого ліпиду А представників виду *Pseudomonas aeruginosa* [22].

Ліпід А представників виду *P. aeruginosa* може бути представлений гексаацильною формою (див. рис. 1.5), яка має шість жирних кислот, що розташовані по 3 біля кожного глюкозаміну. Первинні ланцюги жирних кислот – це ті, які безпосередньо зв'язані з глюкозаміном. У представників виду *P. aeruginosa* наявні дві ОН-жирні кислоти, що зв'язані з глюкозаміном через NH і містять 12 атомів карбону з ОН групою в положеннях 2 та 2' [8,22]. Такі кислоти ще називаються 2-гідроксиуроїлами, через О-зв'язок з глюкозаміном розміщуються ще дві з 10 атомами карбону, що є 2-гідроксидеканоїлами, у яких ОН-група локалізована в положеннях 3 та 3' (див. рис. 1.5). Окрім того, у ліпіді А можуть бути наявні вторинні жирні кислоти, які представлені лауроїлами, що мають 12 атомів карбону і приєднані до первинних жирних кислот – 2-гідроксуроїлів через О-зв'язок (див. рис. 1.5) [8,22].

У представників виду *P. aeruginosa* [8] може бути наявний пентаацильний ліпід А, який на відміну від гексаацильованого ліпиду А, не містить первинної жирної кислоти з 10 атомами карбону, що приєднана до глюкозаміну через О у положенні 3 першого глюкозаміну (рис. 1.6).

Загальні закономірності ацилювання зберігаються у різних представників виду *P. aeruginosa*. Неоднорідність спостерігається лише

стосовно кількості первинних жирних кислот, кількості та положення вторинних жирних кислот [8,23].

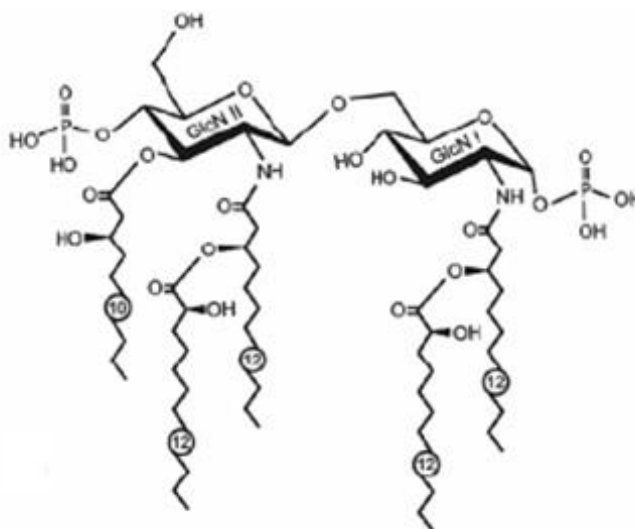


Рис. 1.6. Структурна організація пентаацильованого ліпиду А представників виду *Pseudomonas aeruginosa* [8].

Структурно різні типи ліпиду А можуть виникати за різних умов культивування. Зокрема, у 75 % усіх штамів, що підтримуються в лабораторних умовах, ліпід А є пентаацильованим та у 25 % є гексаацильованими [8].

Залежно від наявності фосфатних груп у ліпіді А, в положеннях 1 та 4', може змінюватися сумарний заряд поверхні, оскільки фосфатні групи надають негативного заряду молекулі [24]. Він може змінюватися, залежно від чинників навколишнього середовища, зокрема таких як: температура, рН, наявності/відсутності антибіотиків чи антимікробних пептидів [24]. Фосфатні групи можуть опосередковувати взаємодію із сусідніми фосфорильованими структурами ліпиду А за участі двовалентних катіонів, що присутні у середовищі. Вони значно підвищують стійкість зовнішньої мембрани бактерій та знижують проникність клітинної стінки [24].

Таку саму будову гексаацильованого та пентаацильованого ліпиду А мають представники виду *Pseudomonas syringae*, з єдиною відмінністю у

тому, що вторинні жирні кислоти є різними, з 12 атомами карбону без ОН групи та з 12 атомами карбону, та гідроксильною групою біля 2 атому С [25].

У філогенетично найближчого родича *P. mandelii* – *P. fluorescence* – виявлено [26] подібний склад ліпиду А до *P. aeruginosa* та *P. syringae*. Проте у штамів *P. fluorescence* 4125 та 7769 наявні жирні кислоти з 16 та 18 атомами карбону. Штами *P. aeruginosa* мають більш короткі жирні кислоти з кількістю карбонів від 10 до 12, порівняно з 14 атомами ентеробактерій, що пояснює значно більш низьку токсичність для піддослідних тварин ліпиду А представників виду *P. aeruginosa*, порівняно з ліпідом А ентеробактерій [8].

Таким чином, нині остаточно з'ясовано структурну організацію ліпиду А у представників видів *P. aeruginosa*, *P. syringae*, *P. fluorescence*, натомість жирнокислотний склад ліпиду А виду *P. mandelii* не було вивчено.

1.2.2. Будова та структура корової частини ЛПС. Кор – це складна структура, яка складається з моносахаридів, що не повторюються. Він сформований з двох частин: внутрішньої, яка з'єднана з ліпідом А через О-глікозидний зв'язок з 2-кето-3-дезоксиктоновою кислотою (КДО), і зовнішньої, що поєднана з О-специфічними ланцюгами (рис. 1.7) [27].

До складу внутрішньої частини кору входять залишки 2-кето-3-дезоксиктонової кислоти (рис. 1.7), наявність яких є життєво необхідною для грамнегативних бактерій. Зазвичай до складу кору ЛПС входять від 1 до 3 молекул КДО. Ще одним обов'язковим компонентом є залишки гептози, до складу яких входять кілька фосфатних груп (див. рис. 1.7) [28]. Олігосахаридам зовнішнього кору притаманна більша структурна різноманітність, порівняно з внутрішнім [24].

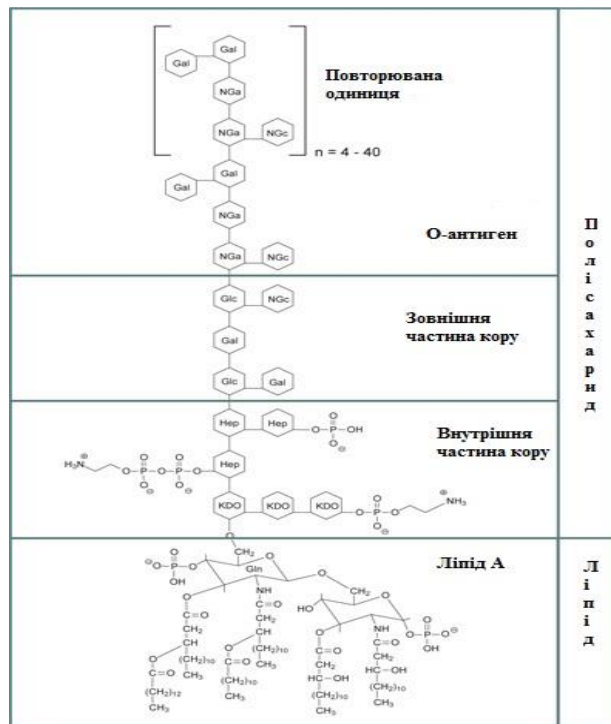


Рис. 1.7. Загальна структура ліпополісахаридів грамнегативних бактерій [адаптовано 29].

Наприклад, у клітин штаму *P. aeruginosa* PAO1 внутрішня частина кору містить два залишки КДО (KdoI і KdoII) та два – L-гліцеро-D-манно-гептози (HepI і HepII) (рис. 1.8) [1,8,30]. З другим залишком гептози II у положенні 7 зв'язана О-карбомільна група. Дві гептози фосфорильовані в положеннях 2 і 4 гептози I і в положенні 6 гептози II [31]. Фосфатні замісники можуть бути моно- та навіть трифосфатами. Фосфорилування залишків гептоз, що входять до складу кору ЛПС *P. aeruginosa*, відіграє важливе значення у життєдіяльності бактерій. Зокрема, фосфорилування HepI у положенні 4 призводять у бактерій до летальних наслідків [30].

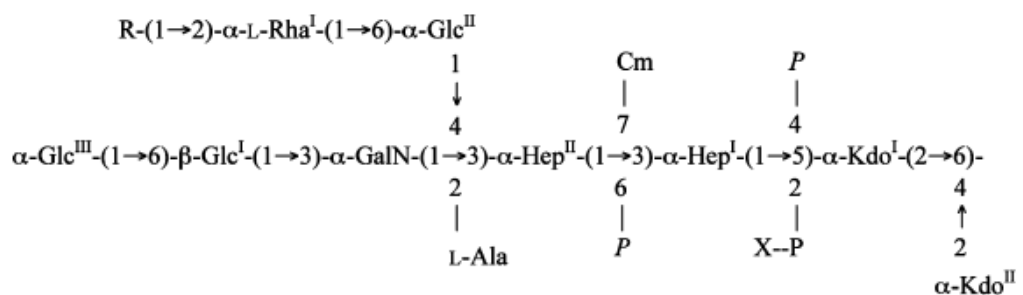


Рис. 1.8. Будова кору ЛПС клітин штаму *P. aeruginosa* PAO1 [30].

Зовнішня частина кору ЛПС у представників виду *P. aeruginosa* може синтезуватися у вигляді двох різних ізоформ, які називають глікоформи. До складу останніх входить галактозамін, з залишком аланіну, три залишки D-глюкози та один залишок L-рамнози, положення яких відрізняється у різних глікоформ. Так, штам *P. aeruginosa* PAO1 характеризується наявністю глікоформи 1, що містить три залишки глюкози. Причому два з них – це α -глюкоза та один – β -глюкоза (див. рис. 1.8). Окрім того, у зовнішньому корі, для сахаридів притаманне значне O-ацетилювання гідроксильних груп. Втім ацетати присутні у слідовій кількості, що ускладнює чітке структурне визначення цих замісників [1,8,30].

Зовнішня частина кору у штаму *P. aeruginosa* PA103 представлена глікоформою 1, аналогічно до цієї частини кору штаму *P. aeruginosa* PAO1. Відмінність у структурній організації цієї частини ЛПС цих штамів полягає в тому, що штам *P. aeruginosa* PA103 містить N-ацетил-D-галактозамін замість галактозаміну з залишком аланіну [8,30,31]. Натомість, ЛПС штаму *P. aeruginosa* 170041 [8,30,31] характеризується наявністю глікоформи 2 у зовнішній частині кору і відрізняється від глікоформи 1 місцем приєднання рамнози, яка галузиться не від галактозаміну, а від глюкози. У серогруп *P. aeruginosa* O14 та O15 у глікоформі 2 зовнішня частина кору заміщення O-специфічним ланцюгом.

Аналогічну до штаму *P. aeruginosa* PAO1 будову кору має штам *P. syringae* GSPB 711 [25]. Внутрішня частина є ідентичною, а у зовнішній частині кору відмінним є те, що галактозамін із залишком аланіну приєднаний у другому положенні. Ще однією відмінністю є кількість залишків глюкози, у клітин штаму *P. syringae* GSPB 711 їх два – β -глюкоза, що приєднана до галактозаміну у положенні 3 та α -глюкоза, що приєднана до галактозаміну у положенні 4. Ще однією особливістю є наявність N-ацетилглюкозаміну, що приєднаний до β -глюкози у положенні 2 [25].

ЛПС штаму *P. fluorescence* ATCC 49271 [32], на відміну від штамів *P. syringae* GSPB 711, *P. aeruginosa* PAO1 та *P. aeruginosa* 170041, у

внутрішній частині кору містить лише один залишок КДО, до якого у 5 положенні приєднана α -гептоза. Зовнішня частина кору цього штаму виявляє певну подібність до зовнішнього кору згаданих штамів. Остання містить галактозамін із залишком аланіну, що приєднаний у 2 положенні. Ця частина також містить три залишки глюкози, два з яких є β -глюкозою та один - α -глюкозою (рис. 1.9).

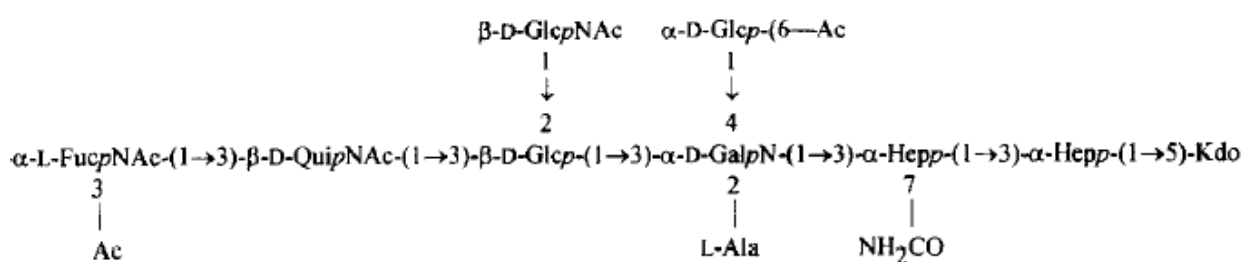


Рис. 1.9. Схема будови кору ЛПС клітин штаму *P. fluorescence* ATCC49271 [32].

Особливістю зовнішньої частини кору ЛПС штаму *P. fluorescence* ATCC 49271 є наявність залишку 2-ацетамідо-2,6-дидезокси-D-глюкози, що з'єднаний у 3 положенні β -глюкози та залишку N-ацетил-L-фукозаміну, який приєднаний у 3 положенні залишку 2-ацетамідо-2,6-дидезокси-D-глюкози (див. рис. 1.9) [32].

1.2.3. Будова та структура О-специфічних ланцюгів ЛПС псевдомонасів. О-специфічні ланцюги ЛПС у грамнегативних бактерій з'єднуються із зовнішньою частиною кору, а саме з його термінальним моносахаридом, через глікозидний зв'язок. Їхнє структурне різноманіття надзвичайне. Вони складаються з повторюваних сахаридних субодиниць, сформованих з 3-5 (іноді до 8) залишків цукрів, що представлені гексозами, пентозами, дезокси- і О-метильними похідними з нейтральних моносахаридів. Проте також зустрічаються заряджені сахариди – це аміногексози, амінопентози, гексуранові та гексозаміноуронові кислоти, що несуть низку замісників [28,33,34]. Окремі О-ланцюги можуть відрізнятися

1.3. Біологічна активність ліпополісахаридів грамнегативних бактерій

За функціональною активністю ЛПС є ендотоксином. Прояв токсичної активності цього інтегрального компоненту клітин грамнегативних бактерій можливий після вивільнення з їхньої клітинної стінки. Наприклад, під час лікування антибіотиками може відбуватися лізис клітини або під час інтенсивного поділу клітин бактерій.

1.3.1. Антигенні властивості ліпополісахаридів. ЛПС є тимус-незалежним антигеном типу 1, що зумовлює його здатність активувати В-клітини без участі Т-клітин [36]. Чинниками вірулентності ендотоксинів можуть бути їх окремі складові. Наприклад, ліпід А, який входить до складу ЛПС і володіє токсичною активністю. А також О-специфічний ланцюг, якому не притаманна токсичність, натомість він володіє імуногенною активністю [37]. Роль у формуванні імунної відповіді цих ланцюгів доводить той факт, що незначні зміни послідовності моносахаридів у бічних ланцюгах ЛПС призводять до значних змін у вірулентності бактерій. За участі О-антигену здійснюється адгезія до клітин, переважно епітеліальних; забезпечується стійкість до фагоцитозу, оскільки мутантні за цим антигеном штами бактерій, активніше поглинаються та руйнуються фагоцитами [1,33,37]. Також за рахунок гідрофільності, О-полісахаридні ланцюги виконують роль водорозчинних переносників для ліпиду А. О-антигени забезпечують уникання ендотоксином реакцій з антитілами та системою комплементу. Проте існують відмінності у реакції, що відбувається на кінцях полісахаридних ланцюгів. Якщо вони є укороченими або відсутні, то антитіла реагують по іншому, власне на самі клітини бактерій, і тоді відбувається залучення системи комплементу [37].

Залежно від антигенного складу О-ланцюгів розрізняють окремі серотипи псевдомонад (як було зазначено у п.1.2.2.). Клітини, що належать до різних серотипів взаємодіють з клітинами організму хазяїна, незалежно

від попередньої імунної реакції на клітини інших серотипів. О-специфічні антигени здатні викликати імунну відповідь, яка проте не забезпечує повної елімінації ендотоксину з організму хазяїна [37].

Токсична активність ЛПС опосередковується головним чином ліпідом А. Цей компонент виявляє активність лише після вивільнення з ліпополісахариду зовнішньої мембрани грамнегативних бактерій. Введення живих або інактивованих клітин бактерій, або очищених препаратів ЛПС експериментальним тваринам призводить до формування широкого спектру неспецифічних патофізіологічних реакцій. Зокрема, таких як: лихоманка, лейкоцитоз, внутрішньосудинне згортання крові, гіпотензія, анафілактичний шок та загибель. Вплив ліпополісахариду на макроорганізм носить дозозалежний ефект. Так, наприклад, введення мишам 25 мкг ЛПС *P. putida* виявляє імуностимулювальну дію, натомість доза 200 мкг призводить до загибелі мишей [38]. Присутність ліпиду А в організмі експериментальних тварин супроводжується циклічністю проявів, зокрема виділяють латентний період, розвиток патофізіологічних ефектів (діарея, шок) та загибель. Швидкість загибелі лабораторних тварин залежить від дози ендотоксину, шляху введення та виду тварин [37].

1.3.2. Механізми розпізнання ЛПС грамнегативних бактерій імунною системою організму хазяїна. Зв'язування ЛПС з кластером диференціювання 14 (CD14) призводить до активування MAP-кіназного шляху. Внаслідок цього відбувається елімінація ЛПС бактерій з організму хазяїна за участі ліпопротеїдів високої щільності (ЛПВЩ), ліпопротеїдів низької щільності (ЛПНЩ), лізоциму, лактоферину та катіонного антимікробного білку 18. Результатом такої елімінації є гальмування біологічних ефектів ЛПС в організмі хазяїна, шляхом виведення цього ендотоксину з кровообігу. Це запобігає взаємодії ліпополісахариду з макрофагами та нейтрофілами, які обмежують запальну реакцію [6].

Протеїн, що зв'язується з ЛПС, внаслідок чого отримав назву ЛПС-зв'язувальний білок (ЛПБ) – це глікозильований білок з молекулярною

масою 58–60 кДа, який синтезується у печінці. ЛПБ є спорідненим до ліпіду А ліпополісахариду. За рахунок електростатичних взаємодій цього білка з ЛПС відбувається перенесення ендотоксину на CD14. Також ЛПС може розпізнаватися Toll-подібними рецепторами (TLR), які локалізовані на поверхні фагоцитів, дендритних та епітеліальних клітин. Але тільки два TLR-рецептори опосередковують імунну відповідь щодо ЛПС – це TLR2 і TLR4 [6,7].

CD14, за рахунок електростатичних взаємодій, переносить ЛПС на адаптер мієлоїдного фактора диференціювання 2 (MD-2) в комплексі, що складається з TLR4, MD-2 та ЛПС (рис. 1.12). Взаємодія ЛПС з MD-2 та TLR4 відбувається через жирнокислотні ланцюги ліпіду А, які розташовуються всередині MD-2 кишені. Другий карбон жирнокислотного ланцюга ліпіду А зв'язується з гідрофобними амінокислотами TLR4, а фосфатні залишки глюкозамінів беруть участь у іонних взаємодіях з TLR4 [6,7].

Цей односпрямований сигнальний каскад ЛПС від ЛБП до TLR4 та MD-2 зумовлений спорідненістю вище зазначених рецепторів ЛПС до відповідних лігандів [6]. Зв'язування трансмембранного рецептора TLR4 з MD2 призводить до фосфорилування мієлоїдного фактора диференціювання 88 (MyD88). Останній фосфорилує цитозольний адаптерний білок Toll/інтерлейкін-1 рецепторного домену (TIRAP). TIRAP, у свою чергу, активує інтерлейкін-1 рецептор-опосередковані кінази (IRAK) шляхом білок-білкових взаємодій, в які залучено два адаптерні білки IRAK4 та IRAK1. IRAK зв'язується з RING-доменом E3 убіквітинлігази фактора асоційованого з рецептором TNF (TRAF6) [6,7].

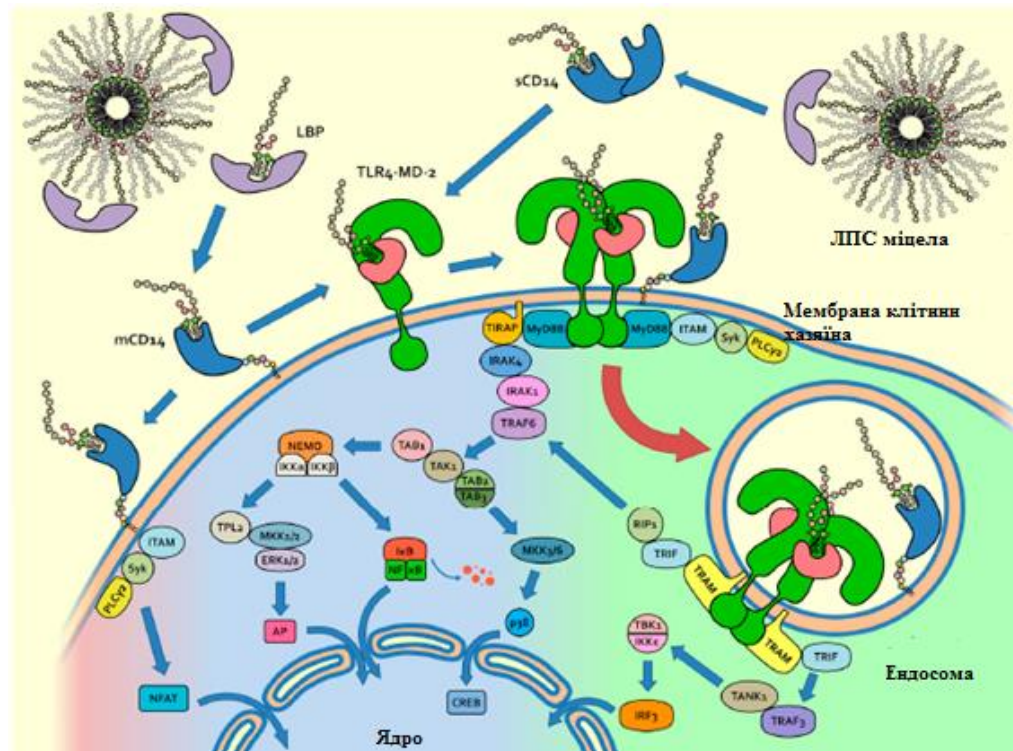


Рис. 1.12. Схема сигнального шляху, що активується у відповідь на ЛПС [адаптовано 6].

TRAF6 сприяє поліубіквітінізації як власне TRAF6, так і TAK1 протеїнкіназ, що активуються TNF- β . TAK1 належить до родини MAPKKK кіназ та утворює комплекс з регуляторними субодиницями кінази, що є TAK-1 асоційованим зв'язувальним протеїном 1 (TAB1), кінази, що активується TGF- β 2 (TAB2) та кінази, що активується TGF- β 3 (TAB3). Ці ферменти взаємодіють з поліубіквітиновими ланцюгами TRAF6 для подальшого активування TAK1 [6,7].

TAK1 кіназа здатна активувати два різні шляхи, зокрема NF- κ B і MAPK, наслідком активування яких є активування комплексу IKK. Цей комплекс складається з каталітичних субодиниць IKK α та IKK β , та регуляторної субодиниці модулятора шляху NF- κ B, що на рис. 1.12 позначений як NEMO. Через убіквітинові ланцюги TAK1, зв'язується з комплексом IKK, що дозволяє йому фосфорилувати і активувати IKK β [6,7]. Комплекс IKK фосфорилує білок I κ B α , який інгібує транскрипційний фактор NF- κ B. I κ B α зазнає протеосомної деградації, в результаті чого відбувається транслокація

NF- κ B в ядро. Цей фактор стимулює індукцію експресії генів, продукти яких сприяють синтезу запальних цитокінів, таких як інтерлейкіни – IL-1, IL-6, IL-8, фактор некрозу пухлини A [7].

В результаті активування TAK1 також активуються інші члени родини MAPK, зокрема, позаклітинно регульована кіназа (ERK1/2), білок p38 та c-Jun N-термінальна кіназа (JNK), що опосередковують активування факторів транскрипції родини активуючих білків 1 (AP-1) або стабілізацію мРНК для регуляції запальних реакцій [7].

Таким чином, чинниками вірулентності ендотоксинів є ліпід A та O-специфічний ланцюг, а механізм розпізнавання ЛПС клітинами організму хазяїна забезпечується двома сигнальними шляхами, такими як MAP-кіназний та NF- κ B.

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА

РОЗДІЛ 2

ОБ'ЄКТИ, МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1. Характеристика штаму, використаного у дослідженні та умови культивування

Для отримання ліпополісахариду у роботі використовували штаму *Pseudomonas mandelii* U1, виділений зі зразків моху на острові Галіндез в Антарктиді, д.т.н. Таширевим А.Б. Цей штаму підтримується у відділі екстремофільних мікроорганізмів Інституту мікробіології та вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України на скошеному м'ясо-пептонному агарі (МПА) за температури + 4 °С. Для подальшого виділення і характеристики ЛПС штаму культивували на МПА за кімнатної температури (+ 18 °С) протягом 48 годин.

2.2. Реактиви, розчини та середовище культивування, які було використано у роботі

У роботі використовували такі реактиви:

– органічні речовини та кислоти: фенол C_6H_5OH (х.ч., ТОВ НВП Альфарус, Україна); ацетон (х.ч., ТОВ НВП Альфарус, Україна); глюкоза (ос.ч., ТОВ НВП Альфарус, Україна); піридин (ч.д.а., ТОВ НВП Альфарус, Україна); хлороформ (х.ч., ТОВ НВП Альфарус, Україна); агароза (ТОВ НВП Альфарус, Україна); 2-тіобарбітурова кислота (х.ч., Sigma, США); бутанол $C_4H_{10}O$ (х.ч., Sigma, США); метанол CH_4O (х.ч., Sigma, США); *n*-гексан (ч.д.а., Lab-Scan, Ірландія).

– неорганічні речовини та кислоти: гідроксид натрію $NaOH$ (ч.д.а., ТОВ НВП Альфарус, Україна); тартат натрію $NaC_4H_4NaO_6$ (х.ч., ТОВ НВП Альфарус, Україна); кристалогідрат сульфату міді $CuSO_4 \times 5H_2O$ (х.ч., ТОВ

НВП Альфарус, Україна); сірчана кислота H_2SO_4 (х.ч., ТОВ НВП Альфарус, Україна); розчин перхлоратної кислоти HClO_4 (х.ч., ТОВ НВП Альфарус, Україна); соляна кислота HCl (х.ч., ТОВ НВП Альфарус, Україна); карбонат натрію Na_2CO_3 (х.ч., ТОВ НВП Альфарус, Україна); натрій хлористий NaCl (х.ч., ТОВ НВП Альфарус, Україна).

– середовища: м'ясо-пептонний агар (МПА), такого складу (г/л): м'ясо ялове (500 г/л), пептон (10 г/л), натрій хлористий NaCl (5 г/л), агар (15 г/л).

Під час виконання роботи використовували розчини: реактив Фоліна (ч.д.а, ООО Хімлаборреактив, Україна), реактив А (карбонат натрію Na_2CO_3 , 2%-ий розчин в 0,1 н NaOH), реактив В (кристалогідрат сульфату міді $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$, 0,5%-ий розчин в 1%-ому розчині тартату натрію), реактив С (лужний розчин міді, суміш 50 мл реактиву А з 1 мл реактиву В).

Для побудови калібрувальної кривої для визначення білка по Лоурі 1 %-ий розчин бичачого сироваткового альбуміну (БСА) (Sigma, США).

2.3. Отримання та характеристика ЛПС штаму *P. mandelii* U1

2.3.1. Виділення та визначення чистоти препаратів ЛПС. Після культивування клітини бактерій змивали невеликою кількістю фізіологічного розчину і відділяли центрифугуванням, процес повторювали тричі [39,40]. Для отримання ЛПС використовували метод водно-фенольної екстракції висушених ацетоном і ефіром клітин згідно з Вестфалем та Янном [39,41].

Вміст білків визначали методом Лоурі [42], калібрувальний графік будували, використовуючи розведення БСА з кінцевою концентрацією у зразках 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140, 160, 200 мкг/мл.

Визначення вмісту нуклеїнових кислот проводили методом Спіріна [43,44,45]. Наважку препарату ЛПС гідролізували в 0,5 N розчину HClO_4 протягом 20 хв за температури 100 °С на водяній бані. Зразки охолоджували до кімнатної температури, центрифугували 20 хв за 5000g на центрифугі РС-40. Спектр поглинання надосаду в ультрафіолетовій частині за допомогою

спектрофотометру СФ-26 за довжини хвилі 270 та 290 нм. Як контроль використовували 0,5 N розчин HClO_4 . Різниця між обома величинами, поділена на 0,19 вказувала на вміст фосфору нуклеїнових кислот в 1 мг дослідного розчину. Для перерахунку кількості фосфору на вміст нуклеїнових кислот застосовували формулу (2.1), середній коефіцієнт перерахунку – 10,3 (для ДНК – 10,1, а для РНК – 10,5).

$$C = \frac{E_{270} - E_{290}}{0,19} \quad (2.1)$$

де, C – вміст фосфору нуклеїнових кислот, мкг;

E_{270} – екстинція дослідного розчину за довжини хвилі 270 нм;

E_{290} – екстинція дослідного розчину за довжини хвилі 290 нм;

0,19 – питома екстинкція.

2.3.2. Визначення хімічного складу препаратів ЛПС. Кількісне визначення вуглеводів проводили по Дюбуа та ін. [46]. До дослідного розчину додавали H_2O , 5 %-ий розчин фенолу і концентровану H_2SO_4 у співвідношенні (v/v, мл) 2 : 1 : 5 [39]. Суміш витримували за кімнатної температури впродовж 40 хв. Вміст вуглеводів у зразках визначали спектрофотометрично, за довжини хвилі 490 нм в кюветах товщиною 1 см. Кількість вуглеводів вираховували за калібрувальною кривою, яку побудували за розчином D-глюкози різних концентрацій (мкг/мл).

Наявність 2-кето-3-дезоксиктонової кислоти в ЛПС визначали за реакцією із тіобарбітуровою кислотою [39,40,45]. Наважку препарату розчиняли у 0,25 N розчину H_2SO_4 у співвідношенні (m/v, мг/мл) 4 : 1, і нагрівали на водяній бані (100 °C) протягом 8 хв. Після охолодження до кімнатної температури, до зразків додавали 0,1 N водний розчин йодної кислоти (HIO_4) і витримували впродовж 10 хв за температури 55 °C. Суміш охолоджували до кімнатної температури, додавали 4 %-ий кислий розчин арсеніту натрію, а також 0,6 %-ий водний розчин тіобарбітурової кислоти і після перемішування нагрівали 10 хв при 100 °C. Забарвлену в жовтий колір суміш охолоджували і, перемішуючи, додавали підкисленого бутанолу. Вище

зазначені компоненти додавали до зразків у співвідношенні (v/v) 1 : 4 : 16 : 20. Суміш центрифугували за 3000g протягом 10 хв. Поглинання забарвленого бутанольного шару вимірювали за допомогою спектрофотометра СФ-26 за довжині хвилі 552 і 508 нм. Різниця ($A_{552} - A_{508}$) є лінійною функцією концентрації КДО. Величина, яка дорівнює 0,4, відповідає 10 мкл 0,01 N розчину амонійної солі КДО (27,3 мкг).

Ідентифікацію нейтральних моносахаридів проводили після гідролізу 3 мг препаратів в 2 N HCl (5 год, 100 °C) [39,45]. Після гідролізу зразки висушували та відмивали тричі дистильованою водою. До зразків додавали розчин боргідриду натрію та витримували 10 год за кімнатної температури у захищеному від світла місці. Отриману суміш нейтралізували за допомогою іонообмінної смоли КУ-2 в H^+ формі, фільтрували, висушували і тричі обробляли метанолом та випаровували. До зразків додавали розчин перегнаного піридину та оцтовокислого ангідриду у співвідношенні (v/v, мл) 1 : 1 і гідролізували протягом 15 хв за температури 100 °C. Висушували, додавали розчин перегнаного хлороформу, центрифугували за 2500 g, 20 хв. Після цього супернатант, який містив суміш нейтральних моносахаридів у вигляді ацетат поліолів, розділяли у хромато-мас-спектрометричній системі Agilent 6890N/5973 inert, колонка DB-225 mS 30 м × 0,25 мм × 0,25 мкм, газ носій – гелій, потік через колонку 1 мл/хв. Температура випаровування – 250 °C, інтерфейсу – 280 °C, термостату – 220 °C, ізотермічний режим [39,45]. Ідентифікацію моноцукридів здійснювали шляхом порівняння стандартних і дослідних зразків з використанням набору, до якого входили: рамноза, фукоза, рибоза, арабіноза, ксилоза, маноза, галактоза, глюкоза. Кількісне співвідношення окремих моносахаридів визначали у відсотках від загальної кількості за співвідношенням площ всіх піків моноцукридів [39,45].

Для визначення жирнокислотного складу наважку препарату розчиняли у 1,5 %-ому розчині хлористого ацетилю в метанолі у співвідношенні (m/v, мг/мл) 2,7 : 1 і гідролізували при температурі 100 °C в запаяних ампулах протягом 5 год. Метилові ефіри жирних кислот екстрагували тричі гексаном

[39,45]. Фракцію *n*-гексану відбирали і висушували на вакуумному випаровувачі. Аналіз метилових ефірів жирних кислот проводили у хромато-мас-спектрометричній системі Agilent 6890N/5973 inert. Обробку результатів здійснювали із застосуванням стандартної суміші метилових ефірів жирних кислот (Supelco, США) [39,40,45]. Кількісний вміст жирних кислот виражали у % до загальної суми площ піків.

2.4. Визначення біологічної активності ЛПС штаму *P. mandelii* U1

2.4.1. Встановлення пірогенності отриманих препаратів ЛПС.

Пірогенну дію ЛПС вивчали на трьох кролях породи Сірій Велетень, вагою 3,5 кг шляхом внутрішньовенного введення мінімальної пірогенної дози ЛПС з подальшою термометрією тварин протягом 3 годин [39]. Термометрію проводили упродовж трьох діб зранку до годівлі за допомогою електронного термометру, який вводили в пряму кишку на глибину 5-7 см, залежно від ваги кроля. Перед початком експерименту всіх тварин перевіряли на імунореактивність шляхом внутрішньовенного введення стерильного апірогенного розчину хлориду натрію з розрахунку 10 мл на кг живої ваги.

Дослідні препарати ЛПС розчиняли в стерильному апірогенному ізотонічному розчині NaCl, який перед введенням витримували протягом 10 хв за температури 37 °C [39,45]. Після цього вводили внутрішньовенно у крайову вену вуха кролів з розрахунку 1 мл/кг ваги тварини. Використовували мінімальну пірогенну дозу препаратів ЛПС, яка попередньо була визначена авторами [39] в серії розведень від $0,5 \times 10^{-2}$ до $1,0 \times 10^{-2}$ мг/мл.

Кожну серію дослідних препаратів ЛПС перевіряли на трьох кролях, близьких за вагою, тобто які відрізнялись між собою не більш, ніж на 0,5 кг [39]. Перед введенням розчину препаратів ЛПС у кролів двічі з інтервалом 30 хв вимірювали температуру тіла. Результати 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 годину. Дослідний розчин ЛПС вважали непірогенним, якщо сума підвищень температур у 3-х кролів була меншою або дорівнювала 1,4 °С. Якщо ця сума перевищувала 2,2 °С, то дослідний препарат ЛПС вважали пірогенним [39,45].

2.4.2. Отримання антисироватки, специфічної до корпускулярного антигену штаму *P. mandelii* U1, та визначення антигенної активності препаратів ЛПС. Антисироватку отримували шляхом імунізації кролів породи Сірій Велетень за такою схемою [39]. Для цього піддослідним кролям п'ять разів вводили внутрішньовенно антиген (суспензію мікробних клітин) у зростаючих дозах (168 млн/мл, 336 млн/мл, 504 млн/мл, 850 млн/мл) з інтервалом між ін'єкціями 5 діб.

Для отримання антигену використовували клітини культури *P. mandelii* U1, яку вирощували на МПА упродовж 24 годин за температури +18 °С. Культуру з поверхні середовища змивали невеликою кількістю фізіологічного розчину NaCl та прогрівали упродовж 2,5 год за температури 100 °С [39]. Суспензію клітин необхідної концентрації виготовляли, використовуючи стандарт оптичної каламуті виробництва ГІСК ім. Л. А. Тарасевича.

Кров у тварин відбирали на сьомий день після останнього введення антигену. Забір крові проводили з крайової вени вуха (20-30 мл) [39]. Отриману кров для формування згустку і відділення сироватки годину витримували за температури +37 °С. Після цього витримували за температури +4 °С упродовж 20 год. Остаточне відділення сироватки здійснювали шляхом центрифугування протягом 20 хвилин за 1500g. Після центрифугування обережно відбирали сироватку, додавали консервант та зберігали у скляному посуді за температури +4 °С.

Імуногенну активність отриманих препаратів ЛПС встановлювали методом подвійної імунодифузії в агарі за Оухтерлоні [39,47]. Під час

постановки реакції використовували 1,2 %-вий агарозний гель, який рівномірно розподіляли у чашці Петрі шаром товщиною 3-4 мм. Лунки в гелі вирізали за допомогою спеціального трафарету. В них вносили 30 мкл препаратів ЛПС, концентрацією 1 мг/мл та нативну сироватку, відповідно до схеми представленої на рис. 2.1. Чашки Петрі поміщали у вологу камеру та витримували за температури 37 °С упродовж 24 – 48 годин. Результат реакції оцінювали через 1-2 доби та фотографували [39,45].

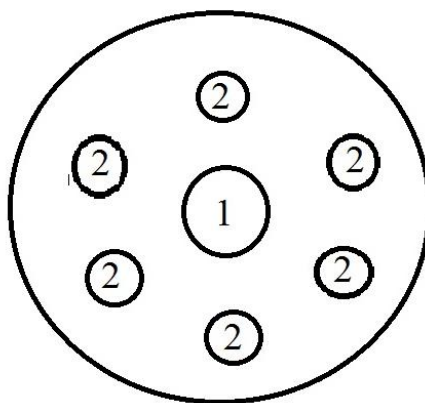


Рис. 2.1. Схема внесення сироватки (1) та препаратів ЛПС (2) в агарозний гель.

РОЗДІЛ 3

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХНЄ ОБГОВОРЕННЯ

3.1. Дослідження складу препаратів ЛПС штаму *Pseudomonas mandelii* U1

Для виділення та подальшої характеристики ЛПС було обрано штам *Pseudomonas mandelii* U1, виділений з моху на острові Галіндез в Антарктиді, який є пристосованим до холодного клімату і може рости за температури + 4 °C, та низьких концентрацій солей NaCl. На цьому етапі роботи характеризували склад отриманих препаратів ЛПС штаму *P. mandelii* U1, для з'ясування жирнокислотного складу ліпополісахариду представників виду *P. mandelii* та моносахаридного складу вказаного компоненту штаму *P. mandelii* U1.

3.1.1. Характеристика препаратів ліпополісахариду, отриманих водно-фенольним методом Вестфалю та Янна. Для одержання препаратів ЛПС застосовували водно-фенольний метод, оскільки цей метод є більш жорстким та ефективним внаслідок того, що суміш фенолу та води характеризується діелектричною сталою [39]. На цьому заснований методичний підхід розподілу білків, полісахаридів та нуклеїнових кислот між двома згаданими фазами. Відділення ЛПС від інших структурних компонентів клітини сумішшю фенолу та води покращує коефіцієнт його розподілу, і загалом здатність до дисоціації [39]. Після процесу виділення, ЛПС міститься у водній фазі разом з білками та нуклеїновими кислотами, проте також може переходити і у фенольну фазу за рахунок наявності у ЛПС гідрофобної вуглеводневої частини, тому для детального аналізу нами було відібрано шість препаратів [39].

В процесі виділення ЛПС було отримано шість фракцій, які відрізнялись між собою візуально. Одна з водних фракцій була прозорою і позначена нами, як препарат 1. Враховуючи те, що за літературними даними [39] ЛПС

переходить у водну фазу, у подальшій роботі цей препарат позначали як ЛПС-1. Інша фракція – молочного кольору, білковій фракції був притаманний білий колір (препарат 5), фенольна фаза була прозорою (препарат 6). Водну фракцію молочного кольору діалізували проти водогінної H_2O , а потім дистильованої H_2O , після чого центрифугували за 2500g впродовж 15 хвилин. Відбирали надосадову рідину, а отриманий осад у подальшій роботі позначали як препарат 2. Супернатант також діалізували проти водогінної H_2O , а потім дистильованої H_2O , та центрифугували за вище описаних умов. Осад позначили як препарат 4, а супернатант – препарат 3 (рис. 3.1). Зважаючи, що ця надосадова рідина являла собою водну фракцію у яку, за літературними даними [39] переходить ліпополісахарид, але відрізнялась за кольором, то у подальшій роботі цей препарат позначали як ЛПС-2.

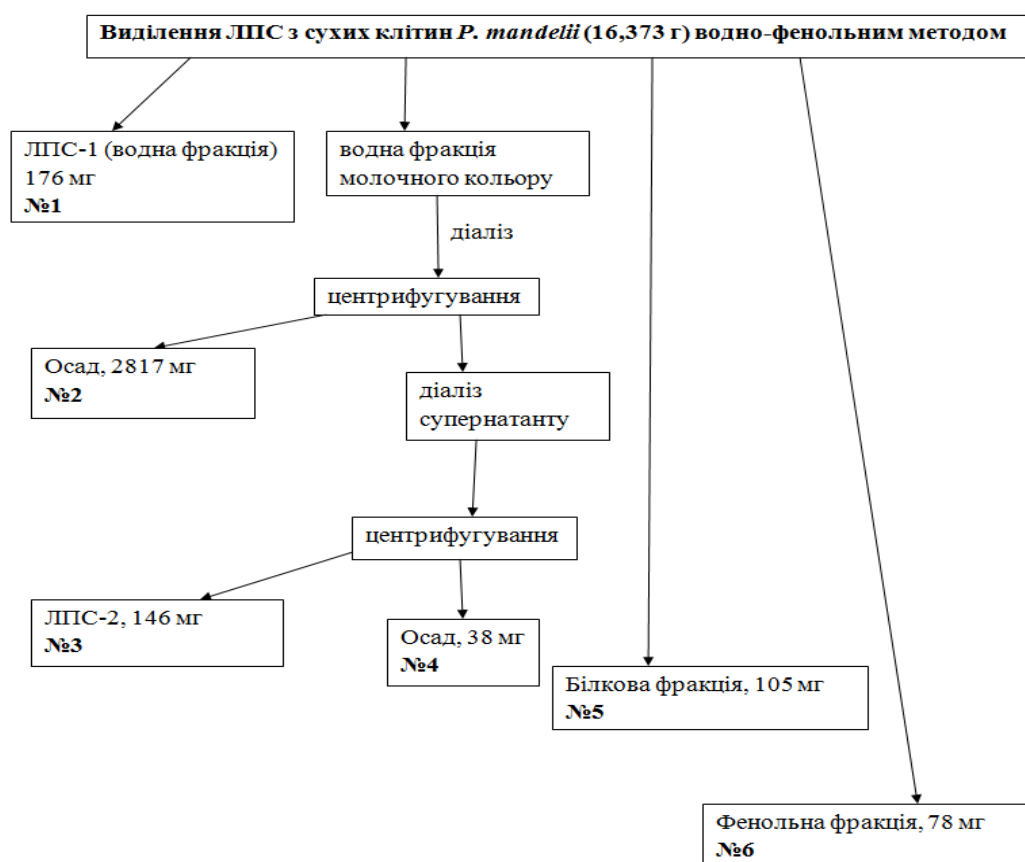


Рис. 3.1. Схема виділення ЛПС з сухої біомаси клітин *P. mandelii* водно-фенольним методом.

Надалі препарати висушували та розраховували їх кількісний вихід з 16,4 г сухої маси клітин. Встановлено, що кількість досліджених препаратів щодо маси сухих клітин становила: 1,1 % для препарату 1, 17,2 % – для препарату 2, 0,9 % – для препарату 3, 0,2 % – для препарату 4, 0,6 % – для препарату 5 та 0,5 % – для препарату 6 (табл. 3.1).

Таблиця 3.1

Кількісний вихід препаратів ЛПС щодо маси сухих клітин штаму
P. mandelii U1

Номер препарату, №	Вихід препарату ЛПС з сухої маси клітин, (%)
ЛПС-1, препарат 1	1,1
Осад, препарат 2	17,2
ЛПС-2, препарат 3	0,9
Осад, препарат 4	0,2
Білкова фракція, препарат 5	0,6
Фенольна фракція, препарат 6	0,5

У результаті порівняльного аналізу препаратів ЛПС нами було встановлено, що вони характеризувались різним вмістом ліпополісахариду. Найвищий вихід притаманний препарату 2. Ми пов'язуємо це з тим, що його було отримано внаслідок одного етапу очищення (рис. 3.1). Разом з тим цей препарат містив найбільшу кількість домішок, що було встановлено при подальшій характеристиці. Препарат ЛПС-2 характеризувався меншим виходом, порівняно з ЛПС-1, внаслідок можливих втрат під час проведення двох додаткових етапів очищення, зазначених на схемі (рис. 3.1). Масовий вихід препарату 4 був найменшим серед усіх досліджених, оскільки він був отриманий внаслідок двох етапів очищення. З білкової та фенольної фракції, ми отримали найменшу кількість препарату, порівняно з трьома попередніми, адже згідно з водно-фенольного методу більша частина ЛПС екстрагується у водну фракцію [39].

За даними, наведеними у літературі, у деяких представників роду *Pseudomonas*, вихід ЛПС може сягати 32 % [3]. Вихід отриманих нами препаратів ЛПС був менший, ніж у препаратах ЛПС видів *P. chlororapsis* subsp. *aureofaciens* (від 11,3 до 12,9 %) та *P. putida* (7,5 %), відповідно [3,38]. На нашу думку, такі результати зумовлені тим, що автори не розподіляли препарат ЛПС за фазами, розраховуючи вихід лише водної фази або усіх фаз разом.

Зважаючи на особливості застосованого методу екстракції, окрім ЛПС у препаратах можуть бути наявні білки та нуклеїнові кислоти. У випадку, коли ці домішки присутні у великій кількості виникає необхідність додаткового очищення препаратів шляхом ультрацентрифугування [3,39]. Зокрема, Варбанець та співавтори стверджують [3], що кількість нуклеїнових кислот в препаратах ЛПС може сягати 30 %. Так, отримані нами препарати містили 0,94 – 8,55 % нуклеїнових кислот та від 2,8 до 31,2 % білків (табл. 3.2). Це засвідчує, що кількість домішок не перевищувала встановлених норм, тому немає необхідності у подальшому очищенні.

Таблиця 3.2

Склад домішок в отриманих препаратах ЛПС штаму *P. mandelii* U1

Компонент	Препарат					
	1	2	3	4	5	6
Нуклеїнові кислоти, (%)	2,9	4,06	2,2	8,6	1,9	0,9
Білок, (%)	2,8	31,2	9,5	11,2	9,5	16,2

3.1.2. Вивчення хімічного складу препаратів ЛПС. Вуглеводи є важливою частиною ЛПС, оскільки входять до усіх його структурних компонентів. Особливо різноманітним за структурним складом вуглеводів є

О-специфічний ланцюг, що є інтегральним компонентом ЛПС та відіграє важливу роль у прояві біологічної активності ЛПС. Не менш важливою сполукою, що міститься у внутрішній частині кору є 2-кето-3-дезоксиктонова кислота (КДО). КДО є маркерною сполукою ЛПС, адже міститься у бактеріальній клітині лише у його складі. Тому, визначення вмісту цієї сполуки є вирішальним для розрізнення препаратів, що містять або не містять ЛПС.

У результаті проведеного аналізу, було встановлено, що всі препарати містили від 11,8 до 21,5 % вуглеводів. Виключення становив препарат 4, у якого було виявлено найменшу кількість вуглеводів (табл. 3.3). Вміст КДО у препараті 1 становив ~0,04 %, у препараті 3 - 0,07 %, у препаратах 5 та 6 - 0,36 та 0,38 %, відповідно. Натомість у препаратах 3 та 4 КДО виявлено не було. Останнє засвідчує відсутність ЛПС у їхньому складі, позаяк була відсутня маркерна сполука дослідженого біополімеру. На нашу думку, такі результати щодо вуглеводного вмісту також зумовлені тим, що препарат 4 не містив ЛПС. У препараті 2 було виявлено вуглеводи, що входять до складу інших структурних компонентів клітини.

Таблиця 3.3

Характеристика хімічного складу отриманих препаратів ЛПС штаму

Компонент	Препарат					
	№1	№2	№3	№4	№5	№6
Вуглеводи, (%)	21,5	16,9	16,9	4,1	21,5	11,8
КДО, (%)	~0,04	-	0,07	-	0,36	0,38

Отримані нами результати узгоджуються з даними інших авторів [2,26] щодо вмісту вуглеводів в препаратах ЛПС представників виду *P. fruorescens*, що філогенетично близькоспоріднений до *P. mandelii*. Так, вміст останніх у

цього виду становить 16,2 % [2,26]. Натомість у препаратах ЛПС інших видів роду *Pseudomonas*, зокрема *P. putida*, *P. chlororopsis*, *P. syringae*, *P. wieringae*, міститься набагато більше вуглеводів (63,2, 35, 39,5 та 45,3 %, відповідно) [2,3,38]. На нашу думку, такі відмінності можуть бути зумовлені різної кількістю моносахаридних ланок О-полісахаридного ланцюга, що є частиною молекули ЛПС.

Отримані нами дані щодо вмісту КДО у препаратах ЛПС штаму *P. mandelii* U1 не узгоджуються з таким у філогенетично близькоспорідненого виду *P. fluorescens*. В препаратах ЛПС цього виду вміст КДО становив 0,6 та 2,8 %, залежно від штаму [2,26]. Різниця вмісту КДО в препаратах ЛПС спостерігається також у інших представників роду. Так, у *P. chlororopsis* він становить 0,5 %; 0,1 % – у *P. putida*; 1,2 % та 2,3 % залежно від штаму *P. syringae*; 1,3 % – у виду *P. wieringae* [2,3,26,38]. Такі результати можуть бути зумовлені тим, що за експериментального дослідження інших видів роду препарати ЛПС не розділяли по фракціям. На нашу думку, ще однією з можливих причин таких відмінностей може бути екранування кислотолабільного зв'язку між КДО та ліпідом А за рахунок фосфатних груп, що приєднані до дослідженого полімеру [48].

Жирні кислоти входять до складу ліпиду А, що є гідрофобною, частиною молекули ЛПС. За рахунок жирних кислот, ЛПС закріплюється у зовнішній мембрані грамнегативних бактерій, за допомогою іонних та гідрофобних взаємодій між фосфоліпідами внутрішнього шару зовнішньої мембрани та жирними кислотами ліпиду А. Жирнокислотний склад ліпиду А є консервативним, тобто відрізняється у кожного виду грамнегативних бактерій і є притаманним лише одному виду. Зважаючи на те, що жирнокислотний склад представників виду *P. mandelii* остаточно не з'ясовано, наступним етапом роботи було вивчення жирнокислотного складу штаму, оскільки він є важливою хемотаксономічною характеристикою, що застосовується для розрізнення представників різних видів.

В жирнокислотному складі досліджених препаратів ЛПС виявлено жирні кислоти з довжиною вуглецевого ланцюга від C_{12} до C_{17} . В ЛПС-2 і ЛПС-ф (препарат 6) переважала додеканова кислота (51,7 і 65,2 %, відповідно). У препараті ЛПС-1 переважала ізо-гептадеканова кислота 59,1 % (табл. 3.4).

Таблиця 3.4

Жирнокислотний склад препаратів ЛПС *Pseudomonas mandelii* U1

Жирна кислота	ЛПС-1, (%)	ЛПС-2, (%)	ЛПС-ф (препарат 6), (%)
(додеканова) $C_{12:0}$	10,2	51,7	65,2
(2-гідроксидодеканова) 2-ОН- $C_{12:0}$	30,7	-	5,2
(3-гідроксидодеканова) 3-ОН- $C_{12:0}$	-	7,4	13,1
(і-гексадеканова) $iC_{16:0}$	-	6,8	-
(гексадеканова) $C_{16:0}$	-	12	6,1
(і-гептадеканова) $iC_{17:0}$	59,1	22,1	10,5

У меншій кількості були наявні гексадеканова (12 %) та ізо-гексадеканова кислоти (6,8 %). Виявлено також гідроксикислоти: 2-гідроксидодеканову, 3-гідроксидодеканову, що є характерними для бактерій роду *Pseudomonas*. Гідроксикислоти вважаються маркерною сполукою жирних кислот ЛПС, адже, у клітинній стінці бактерій, вони наявні лише у складі ЛПС, що доводить належність виявлених жирних кислот саме до жирних кислот ліпиду А ЛПС виду *P. mandelii*.

До складу ЛПС філогенетично близькоспорідненого виду *P. fluorescens*, а саме штамів *P. fluorescens* 4125 та 7769 [26], входять додеканова, 2-гідроксидодеканова, 3-гідроксидодеканова, гексадеканова кислоти. Ці дані узгоджуються з отриманими нами даними жирнокислотного складу ЛПС *P. mandelii* U1. Втім у складі ЛПС штамів *P. fluorescens* 4125 та 7769 наявні деканова, 2-гідроксидеканова, 3-гідроксидеканова та октадеканова кислоти,

які не були виявлені у жирнокислотному складі ЛПС дослідженого штаму *P. mandelii* U1.

Щодо інших представників роду *Pseudomonas*, то у складі ЛПС клітинної стінки бактерій виду *P. aeruginosa* виявлено додеканову, 2-гідроксидодеканову кислоти, що узгоджується з отриманим нами результатами щодо жирнокислотного складу штаму *P. mandelii* U1. Проте представники виду *P. aeruginosa* містять 2-гідроксидеканову кислоту, яка не була виявлена у складі ЛПС бактерій штаму *P. mandelii* U1 [22].

У жирнокислотному складі ЛПС представників виду *P. chlororapsis* переважають 2-гідроксидодеканова кислота, а також виявлені додеканова, 3-гідроксидодеканова, гексадеканова кислоти, що співпадає з жирнокислотним складом ЛПС штаму *P. mandelii* U1 [3]. Цей склад відрізняється лише наявністю у представників виду *P. chlororapsis* 3-гідрокситетрадеканової кислоти.

Жирнокислотний склад ЛПС представників виду *P. putida* відрізняється від жирнокислотного складу ЛПС штаму *P. mandelii* U1 відсутністю ізо-гексадеканової та ізо-гептадеканової кислот [38]. На нашу думку, відсутність ізо-гексадеканової та ізо-гептадеканової кислот у складі препаратів ЛПС інших представників роду *Pseudomonas* вказує на те, що ці жирні кислоти притаманні ліпиду А лише виду *P. mandelii*. Ці дані можуть бути використані як хемотаксономічна ознака для диференціювання цього виду від інших представників роду.

Отже, у роботі вперше було встановлено жирнокислотний склад ЛПС виду *P. mandelii*, що налічує у складі додеканову, 2-гідроксидодеканову, 3-гідроксидодеканову, ізо-гексадеканову, гексадеканову та ізо-гептадеканову кислоти та відрізняється від жирнокислотного складу інших представників роду переважно на одну або дві жирні кислоти, що є видовою специфічністю кожного з видів роду *Pseudomonas*.

Моносахариди входять до складу двох структурних компонентів ЛПС: кору та О-полісахаридного ланцюга. О-специфічні ланцюги з'єднуються із

зовнішньою частиною кору з його термінальним моносахаридом через глікозидний зв'язок. Окремі його ланцюги можуть відрізнятися між собою за довжиною до 40 повторюваних моносахаридів [27,33]. О-полісахаридний ланцюг довший, порівняно з основним олігосахаридним кором і містить гідрофільний моносахаридний домен ЛПС. Дослідження моносахаридного складу ЛПС штаму *P. mandelii* U1 розширить наявну інформацію щодо ЛПС різних представників виду *P. mandelii*.

В моносахаридному складі досліджених препаратів ЛПС було виявлено рамнозу, яка складала 47,5 %, рибозу (51,8 %), глюкозу (52,5 %) та галактозу (37,5 %). Менший відсоток складали арабіноза та два невідомі моносахариди (табл. 3.5).

Таблиця 3.5

Моносахаридний склад препаратів ЛПС *Pseudomonas mandelii* U1

Моносахариди	Препарати		
	ЛПС-1	ЛПС-2	Фенольна ф-я
	% до суми площ піків		
Рамноза	-	8,4	47,5
Рибоза	51,8	-	-
Арабіноза	1,8	-	-
Х-1	9	-	-
Галактоза	-	37,5	-
Глюкоза	27,4	36,7	52,5
Х	9,9	17,4	-

Аналіз моносахаридного складу препаратів ЛПС штаму *P. mandelii* U1 засвідчив, що моносахаридами, які переважають є глюкоза, рибоза, рамноза та галактоза. Також було виявлено два моносахариди, які не входять до складу набору загальновідомих вуглеводів (див. п. 2.3.2), що використовували у дослідженні як еталонний. Можна припустити, що один з цих моносахаридів може бути 3,6-дидезокси-4-С-D-ксилогексоза, яку було описано у складі О-специфічного ланцюга штаму *P. mandelii* CYar1 [4]. Інші виявлені компоненти у складі ЛПС штаму *P. mandelii* CYar1 [4], як рамноза

та глюкоза співвідносяться з виявленими під час дослідження в препаратах ЛПС штаму *P. mandelii* U1.

Наявність рамнози, глюкози, арабінози та галактози співвідноситься з моносахаридним складом препаратів ЛПС філогенетично близькоспорідненого виду *P. fruorescens* [26]. Проте у препаратах цього виду виявлено манозу (штам *P. fruorescens* 4125), яка була відсутня у складі ЛПС *P. mandelii*. Моносахаридний склад ЛПС представників виду *P. putida* є схожим до моносахаридного складу ЛПС штаму *P. mandelii* U1 за наявністю глюкози, галактози та рибози, але відрізняється наявністю манози [38]. На нашу думку така відмінність зумовлена видоспецифічністю моносахаридного складу ЛПС.

Таким чином, моносахаридний склад ЛПС штаму *P. mandelii* U1 налічує рамнозу, рибозу, арабінозу, галактозу, глюкозу та два невстановлених нами моносахариди, та є схожим до моносахаридного складу іншого штаму виду. Серед інших представників роду моносахаридний склад відрізняється незначно, що є видовою специфічністю кожного з видів роду *Pseudomonas*.

3.2. Дослідження біологічної активності препаратів ЛПС штаму *P. mandelii* U1

3.2.1. Вивчення пірогенної дії препаратів ЛПС *P. mandelii* U1.

Препаратам ЛПС може бути притаманна різна пірогенність, що за умови введення в організм може викликати лихоманку у експериментальних тварин. За умови розвитку сепсису пірогенний ендотоксин викликає надмірне вивільнення запальних цитокінів, що призводить до поліорганної недостатності та загибелі. Встановлення пірогенності препаратів ЛПС є найбільш чутливим методом визначення його ендотоксичності [48]. Для встановлення пірогенної дії препаратів ЛПС *P. mandelii* було визначено мінімальну пірогенну дозу, що складає 0,0075 мкг/мл. Введення препаратів ЛПС дозволило з'ясувати, що вже після першої термометрії, яку проводили

через годину після введення мінімальної пірогенної дози препаратів ЛПС-1 та ЛПС-ф, спостерігалось зниження температури тіла кролів на 0,6 та 0,4 °С, відповідно (рис. 3.2).

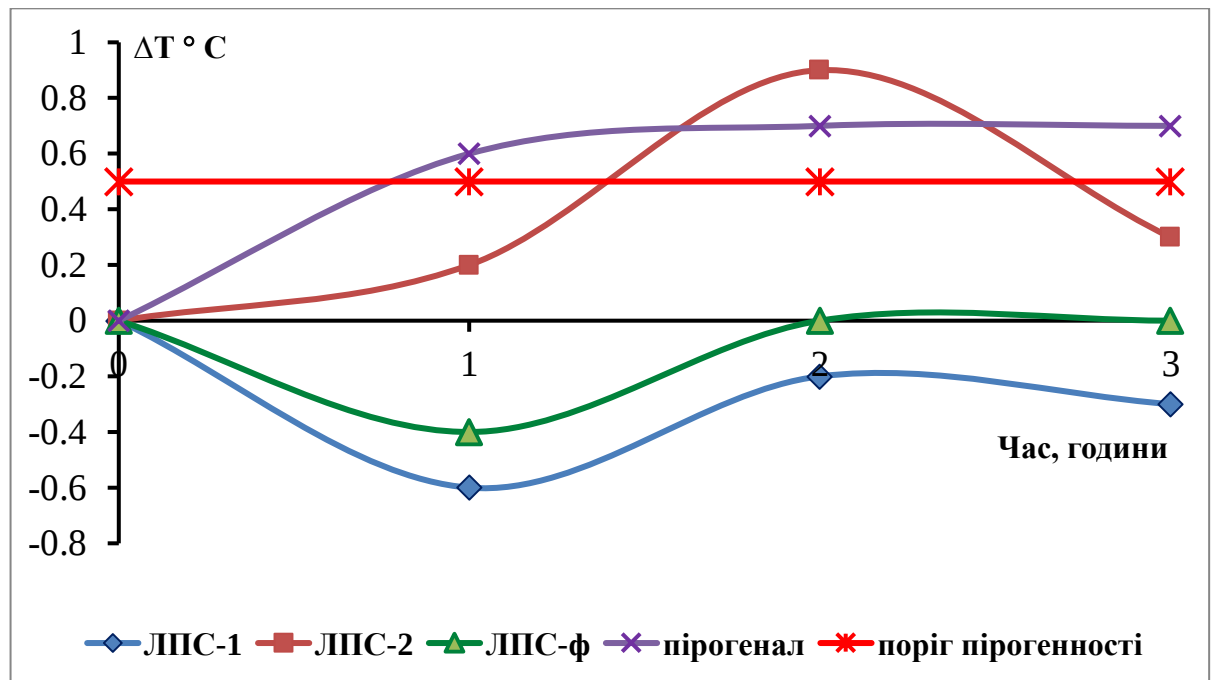


Рис. 3.2. Графік визначення пірогенної активності за введення препаратів ЛПС штаму *P. mandelii* U1 експериментальним тваринам.

Разом з тим результати термометрії лабораторних тварин засвідчили підвищення температури тіла за введення мінімальної пірогенної дози препарату ЛПС-2 на 0,2 °С через 1 годину. Надалі температура тіла кролів підвищувалась на 0,4 °С упродовж 2 годин та залишалась не змінною протягом 3 годин з моменту введення препаратів ЛПС-1 та ЛПС-ф. Температура тіла кролів за умов введення препарату ЛПС-2 підвищувалась на 0,7 °С протягом перших 2 годин з моменту введення мінімальної пірогенної дози та знизилась на 0,5 °С, починаючи з 3 години вимірювання. Таким чином, нами було показано, що препарати ЛПС-1 та ЛПС-ф є апірогенними. Порівняно з ними, препарат ЛПС-2 виявляв вищу пірогенну активність не лише з вище згаданими препаратами, а й фармацевтичним препаратом «Пірогенал», діючим компонентом якого є ЛПС *Shigella typhi*. Подібну апірогенність інші автори [38] виявляли під час оцінювання пірогенної активності ЛПС штаму *P. putida*. Так, після їх введення у

лабораторних тварин також спостерігалось зниження температури тіла, що вказувало на апірогенну дію, порівняно з пірогеналом [38]. Натомість результати термометрії експериментальних тварин після введення їм мінімальної пірогенної дози ЛПС *P. chlororapsis* [3] засвідчили підвищення температури тіла. Ці результати збігаються з даними, отриманими при дослідженні препарату ЛПС-ф. На нашу думку, прояв пірогенної активності очевидно залежить від низки не встановлених під час проведення експерименту чинників, що впливають на стан здоров'я лабораторних тварин, на яких вона досліджується.

Таким чином, вивчення пірогенної активності препаратів ЛПС-1 та ЛПС-ф показало, що ці препарати є апірогенними. Натомість препарат ЛПС-2 характеризувався пірогенністю, що було встановлено при порівнянні з фармацевтичним препаратом «Пірогенал».

3.2.2. Вивчення імуногенної активності препаратів ЛПС штаму *P. mandelii* U1 за допомогою отриманої поліклональної антисироватки, специфічної до корпускулярного антигену. Для отримання антисироватки, специфічної до клітин штаму, використовували корпускулярний антиген, який отримали як описано у розділі 2 (див. п. 2.4.2). Поліклональна сироватка містить антитіла різної специфічності щодо різних антигенних епітопів полідетермінантного імуногену [39]. До основних переваг поліклональних сироваток насамперед належить їхня здатність до формування імунних комплексів з відповідними антигенами [39]. Для встановлення антигенної активності отриманих препаратів ЛПС, застосовували метод подвійної дифузії в агарі за Оухтерлоні, оскільки він дозволяє встановлювати взаємодію антиген-антитіло. Досліджені препарати ЛПС, що являють собою полідетермінантний антиген, дифундували у зону, і взаємодіють з специфічними антитілами [39]. У випадку, якщо кількість обох компонентів реакції еквівалентна, утворюються лінії преципітації, що є комплексом антиген-антитіло. Механізм взаємодії згаданих компонентів забезпечується

електростатичними та вандерваальсовими силами, водневими зв'язками та гідрофобними взаємодіями [49].

В реакції імунодифузії за Оухтерлоні з антисироваткою, специфічною до корпускулярного антигену штаму *P. mandelii* U1, при взаємодії з препаратами ЛПС було виявлено чіткі лінії преципітації (рис. 3.3). Зокрема, дві лінії преципітації було виявлено при взаємодії антисироватки з препаратом 3, препаратом 5 і препаратом 6. Дві лінії преципітації засвідчують наявність в цих препаратах двох антигенів, з якими провзаємодіяла антисироватка. На нашу думку, такі результати свідчать на користь того, що в отриманому препараті ЛПС наявні два антигени, що відповідно до літературних даних [37,39,50] можуть О-специфічними антигенами різної будови. Отримані нами узгоджуються з результатами досліджень інших авторів щодо антигенної специфічності препаратів ЛПС *P. putida* [38].

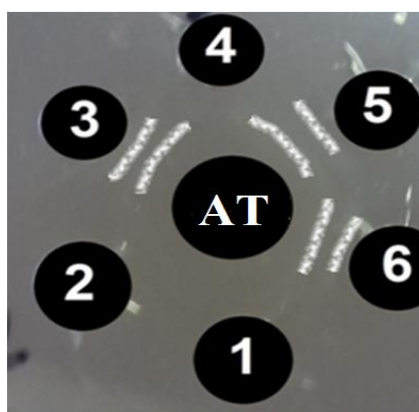


Рис. 3.3. Результати реакції імунодифузії за Оухтерлоні при взаємодії антисироватки та препаратів ЛПС штаму *P. mandelii* U1: АТ – антисироватка, специфічна до корпускулярного антигену, 1 – препарат 1, 2 – препарат 2, 3 – препарат 3, 4 – препарат 4, 5 – препарат 5, 6 – препарат 6.

Таким чином, нами встановлено, що препарат ЛПС-2, білкова та фенольна фракції характеризувалися антигенною активністю, що опосередковано доводить їхню наявність у складі ЛПС штаму *P. mandelii* U1.

УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

Більшість представників роду *Pseudomonas* є мезофільними бактеріями, оптимальна температура росту яких складає $+30 - +35^{\circ}\text{C}$, окрім того до його складу також входять психрофіли, що відрізняються від інших фізіологічних груп роду холодостійкістю. Такі мікроорганізми ростуть за температури $+4^{\circ}\text{C}$, а оптимальною для їхнього розвитку є $+18^{\circ}\text{C}$. Ця властивість може забезпечуватися здатністю до утворення біоплівки, а також наявністю в клітинній стінці цих бактерій особливої структури – зовнішньої мембрани та її окремих компонентів, насамперед ЛПС. Вивчення цього інтегрального компоненту клітинної стінки у психрофільних видів дозволить розширити інформацію щодо складу жирних кислот, які залучені, наприклад, у забезпечення холодостійкості. Ще одним аспектом вивчення ЛПС є з'ясування його ролі у життєдіяльності психрофільних видів.

Для вивчення хімічної будови та складу ЛПС у роботі використовували класичні методи, аналогічні тим, що застосовуються для дослідження інших представників грамнегативних бактерій. Зважаючи на отримані нами результати стосовно хімічної характеристики препаратів ЛПС можна стверджувати, що застосовані методи є ефективними, тому можуть використовуватися для дослідження препаратів ЛПС інших психрофільних видів.

При дослідженні жирнокислотного складу препаратів ЛПС виду *P. mandelii* у роботі було показано, що він налічує додеканову, 2-гідроксидодеканову, 3-гідроксидодеканову, гексадеканову кислоти. Згадані жирні кислоти також наявні у складі ЛПС інших представників роду *Pseudomonas*. Ізо-гексадеканова та ізо-гептадеканова кислоти у жирнокислотному складі представників роду *Pseudomonas* виявлено вперше. Враховуючи, що ці кислоти притаманні виключно представникам цього виду, у подальшому їх наявність можна використовувати як діагностично-диференційну ознаку для розподілу видів роду на підставі

хемотаксономічних ознак. Результати наших досліджень можуть бути використані іншими авторами як підґрунтя для з'ясування структурної організації ліпиду А ЛПС штаму *P. mandelii* U1.

Порівняльний аналіз моносахаридного складу препаратів ЛПС штамів *P. mandelii* U1 та *P. mandelii* CYar1 [4] засвідчив, що він співпадає за наявністю рамнози, рибози, арабінози, галактози, глюкози. Окрім перелічених цукрів, в препараті ЛПС штаму *P. mandelii* U1 було виявлено два моносахариди, природу яких нам не вдалося встановити. Це зумовлено тим, що у роботі було використано набір (склад, якого наведено в п. 2.3.2), в якому були відсутні стандартні вуглеводи, які б дозволили встановити повний моносахаридний склад дослідженого препарату. Тому, ми вважаємо у подальших дослідженнях доцільним застосовувати інші стандарти моносахаридів для визначення невстановлених нами вуглеводів. Також отримані нами результати у подальшому можна використати для визначення будови та структурної організації О-специфічного ланцюга штаму *P. mandelii* U1.

У літературних джерелах зазначається [51], що одна з характеристик ліпиду А визначає пірогенність, токсичність, ад'ювантність та інші властивості. У нашій роботі вивчали пірогенність трьох препаратів ЛПС (ЛПС-1, ЛПС-2, ЛПС-ф). Було показано, що два з них, а саме ЛПС-1 та ЛПС-ф, були апірогенними. Препарат ЛПС-2 був пірогенним. Порівняно з пірогеном, досліджений препарат був більш пірогенним. Отримані результати свідчать про те, що пірогенність препаратів ЛПС залежить очевидно від низки фізіологічних чинників, не встановлених нами під час проведеного експериментального дослідження.

Варбанець та співавтори [51] для серотипування представників роду *Ralstonia* використовували гомологічні та гетерологічні О-антисироватки та корпускулярний антиген для з'ясування О-антигенної специфічності цих бактерій. Автори показали [51], що перехресні взаємодії свідчать про наявність загальних антигенних детермінанти у клітин ралстоній. У нашій

роботі використовували антисироватку, гомологічну до корпускулярного антигену бактерій *P. mandelii* U1, та препарати ЛПС. Методом подвійної імунодифузії за Оухтерлоні було показано наявність двох ліній преципітації при взаємодії антисироватки з препаратом 3, 5 та 6. Це свідчить, що до складу препаратів входять два антигени. На нашу думку, відповідно до літературних джерел [37,39,50] за своєю природою це можуть бути О-специфічні антигени різного складу. З огляду на отримані результати, ми вважаємо за доцільне здійснити подальшу характеристику отриманої антисироватки та препаратів ЛПС за допомогою інших імунологічних методів.

ВИСНОВКИ

- 1) Вперше виділено та охарактеризовано хімічний склад ЛПС штаму *P. mandelii* U1 антарктичного походження та встановлено, що архітектоніка макромолекули є типовою для цього класу біополімерів.
- 2) До складу досліджених препаратів ЛПС входили ліпід А, О-специфічний полісахарид та 2-кето-3-дезоксиктонова кислота, що є показовими для цього біополімеру.
- 3) Отримані препарати ліпополісахаридів містили вуглеводи від 4,1 до 21,5 %, кількість яких коливалась в різних препаратах, та 2-кето-3-дезоксиктонову кислоту (~0,04 – 0,38 %).
- 4) Жирнокислотний склад ЛПС штаму *P. mandelii* U1 представлений додекановою, 2-гідроксидодекановою, 3-гідроксидодекановою, гексадекановою, ізо-гексадекановою та ізо-гептадекановою кислотами. Останні дві кислоти є характерними для цього штаму.
- 5) До складу ЛПС штаму *P. mandelii* U1 входили: рамноза, рибоза, арабіноза, галактоза, глюкоза та 2 вуглеводи, невстановлені нами. Останні два не були ідентифіковані, зважаючи на відсутність відповідних вуглеводів у застосованому наборі.
- 6) Препарати ЛПС-1 та ЛПС-ф є апірогенними, натомість препарат ЛПС-2 характеризувався пірогенністю.
- 7) За допомогою отриманої антисироватки в препаратах 3, 5 та 6 було виявлено два антигени, які очевидно можуть бути О-специфічними антигенами різної будови.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Huszczyński SM, Lam JS, Khursigara CM. The Role of *Pseudomonas aeruginosa* Lipopolysaccharide in Bacterial Pathogenesis and Physiology. *Pathogens*. 2019;9(1):6.
2. Veremeichenko S, Zdrovenko G. Specific structural features and immunomodulatory properties of the lipopolysaccharides of *Pseudomonas* bacteria. *Applied Biochemistry and Microbiology*. 2008;44(6):571-579.
3. Варбанец ЛД, Здоровенко ЭЛ, Киприанова ЕА, Авдеева ЛВ, Броварская ОС, Рыбалко СЛ. Характеристика липополисахаридов *Pseudomonas chlororapsis*. *Микробиология*. 2015;84(6):680–90.
4. Kondakova AN, Drutskaya MS, Shashkov AS, Nedospasov SA, Akimov VN, Arbatsky NP, et al. Structure of the O-polysaccharide of *Pseudomonas mandelii* CYar1 containing 3,6-dideoxy-4-C-[(S)-1-hydroxyethyl]-d-xylohexose (yersiniose A). *Carbohydrate Research*. 2013;381:138–41.
5. Gnauck A, Lentle R, Kruger M. The Characteristics and Function of Bacterial Lipopolysaccharides and Their Endotoxic Potential in Humans. *International Reviews of Immunology*. 2015;35(3):189-218.
6. Cochet F, Peri F. The Role of Carbohydrates in the Lipopolysaccharide (LPS)/Toll-Like Receptor 4 (TLR4) Signalling. *International Journal of Molecular Sciences*. 2017Mar;18(11):2318.
7. Kawasaki T, Kawai T. Toll-like receptor signaling pathways [Internet]. *Frontiers in immunology*. Frontiers Media S.A.; 2014 [cited 2020Apr21]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4174766/#S5title>
8. Knirel Y, Bystrova O, Kocharova N, Zähringer U, Pier G. Review: Conserved and variable structural features in the lipopolysaccharide of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Endotoxin Research*. 2006;12(6):324-336.
9. Verhille S, Baida N, Dabboussi F, Izard D, Leclerc H. Taxonomic Study of Bacteria Isolated from Natural Mineral Waters: Proposal of *Pseudomonas*

- jessenii* sp. nov. and *Pseudomonas mandelii* sp. nov. Systematic and Applied Microbiology. 1999;22(1):45–58.
10. Podstawka A. *Pseudomonas mandelii* CFML 95-303: Type strain: DSM 17967, ATCC 700871, CCUG 42058, CIP 105273, CCM 4842: BacDiveID:13134 [Internet]. BacDive. [cited 2019Dec20]. Available from: <https://bacdive.dsmz.de/strain/13134>
 11. Garrido-Sanz D, Meier-Kolthoff JP, Göker M, Martín M, Rivilla R, Redondo-Nieto M. Genomic and Genetic Diversity within the *Pseudomonas fluorescens* Complex. Plos One. 2016;11(2).
 12. Garrido-Sanz D, Arrebola E, Martínez-Granero F, García-Méndez S, Muriel C, Blanco-Romero E, et al. Classification of Isolates from the *Pseudomonas fluorescens* Complex into Phylogenomic Groups Based in Group-Specific Markers. Frontiers in Microbiology. 2017;8.
 13. Mulet M, Lalucat J, García-Valdés E. DNA sequence-based analysis of the *Pseudomonas* species. Environmental Microbiology. 2010;
 14. Jang S-H, Kim J, Kim J, Hong S, Lee C. Genome Sequence of Cold-Adapted *Pseudomonas mandelii* Strain JR-1. Journal of Bacteriology. 2012;194(12):3263.
 15. Higuera-Llantén S, Vásquez-Ponce F, Núñez-Gallegos M, Pavlov MS, Marshall S, Olivares-Pacheco J. Phenotypic and genotypic characterization of a novel multi-antibiotic-resistant, alginate hyperproducing strain of *Pseudomonas mandelii* isolated in Antarctica. Polar Biology. 2017;41(3):469–80.
 16. Hong S, Lee C, Jang S-H. Purification and properties of an extracellular esterase from a cold-adapted *Pseudomonas mandelii*. Biotechnology Letters. 2012Aug;34(6):1051–5.
 17. Formusa PA, Hsiang T, Habash MB, Lee H, Trevors JT. Genome Sequence of *Pseudomonas mandelii* PD30. Genome Announcements. 2014;2(4).

18. Kegg pathway: Metabolic pathways - *Pseudomonas mandelii*. [cited 2019Dec21]. Available from: https://www.kegg.jp/kegg-bin/show_pathway?pman01100
19. Shannon KEM, Saleh-Lakha S, Burton DL, Zebarth BJ, Goyer C, Trevors JT. Effect of nitrate and glucose addition on denitrification and nitric oxide reductase (cnorB) gene abundance and mRNA levels in *Pseudomonas mandelii* inoculated into anoxic soil. *Antonie van Leeuwenhoek*. 2011;100(2):183–95.
20. Saleh-Lakha S, Shannon KE, Goyer C, Trevors JT, Zebarth BJ, Burton DL. Nitric Oxide Reductase Gene Expression and Nitrous Oxide Production in Nitrate-Grown *Pseudomonas mandelii*. *Applied and Environmental Microbiology*. 2008;74(22):6876–9.
21. Vásquez-Ponce F, Higuera-Llantén S, Pavlov MS, Ramírez-Orellana R, Marshall SH, Olivares-Pacheco J. Alginate overproduction and biofilm formation by psychrotolerant *Pseudomonas mandelii* depend on temperature in Antarctic marine sediments. *Electronic Journal of Biotechnology*. 2017;28:27–34.
22. Werneburg M, Zerbe K, Juhas M, Bigler L, Stalder U, Kaech A et al. Inhibition of Lipopolysaccharide Transport to the Outer Membrane in *Pseudomonas aeruginosa* by Peptidomimetic Antibiotics. *ChemBioChem*. 2012;13(12):1767–1775.
23. King JD, Kocíncová D, Westman EL, Lam JS. Review: Lipopolysaccharide biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Innate Immunity*. 2009;15(5):261–312.
24. Steimle A, Autenrieth I, Frick J. Structure and function: Lipid A modifications in commensals and pathogens. *International Journal of Medical Microbiology*. 2016;306(5):290-301.
25. Здоровенко ЭЛ. Строение липополисахаридов как основа классификации фитопатогенных бактерий *Pseudomonas syringae* [дисертація]. Москва: Инс. орг. хим.; 2002. 138 с.

26. Veremeichenko S, Vodyanik M, Zdorovenko G. Structural Characteristics and Biological Properties of *Pseudomonas fluorescens* Lipopolysaccharides. *Applied Biochemistry and Microbiology*. 2005;41(4):365-371
27. Wang X, Quinn PJ. Lipopolysaccharide: Biosynthetic pathway and structure modification. *Progress in Lipid Research*. 2010;49(2):97–107
28. Ding JL, Ho B. Endotoxin Detection – from *Limulus* Amebocyte Lysate to Recombinant Factor C. *Subcellular Biochemistry Endotoxins: Structure, Function and Recognition*. 2010;;187–208
29. Lipopolysaccharides - Structure, Function and Application [Internet]. Sigma. Available from: <https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/biology/glycobiology/lipopolysaccharides.html>
30. Pier G. *Pseudomonas aeruginosa* lipopolysaccharide: A major virulence factor, initiator of inflammation and target for effective immunity. *International Journal of Medical Microbiology*. 2007;297(5):277–95.
31. Holst O. Structure of the Lipopolysaccharide Core Region. *Bacterial Lipopolysaccharides*. 2011;;21–39.
32. Knirel YA, Helbig JH, Zähringer U. Structure of a decasaccharide isolated by mild acid degradation and dephosphorylation of the lipopolysaccharide of *Pseudomonas fluorescens* strain ATCC 49271. *Carbohydrate Research*. 1996;283:129–39.
33. Lerouge I, Vanderleyden J. O-antigen structural variation: mechanisms and possible roles in animal/plant–microbe interactions. *FEMS Microbiology Reviews*. 2002;26(1):17–47.
34. Raetz CRH, Whitfield C. Lipopolysaccharide Endotoxins. *Annual Review of Biochemistry*. 2002;71(1):635–700
35. Valueva OA, Rakhuba D, Shashkov AS, Zdorovenko EL, Kiseleva E, Novik G, et al. Structure of the Major O-Specific Polysaccharide from the Lipopolysaccharide of *Pseudomonas fluorescens* BIM B-582: Identification of 4-Deoxy-d-xylo-hexose As a Component of Bacterial Polysaccharides. *Journal of Natural Products*. 2011;74(10):2161–7.

36. Koloch BF. Immune Response against Bacterial Lipopolysaccharide [Internet]. OMICS International. OMICS International; 2016 [cited 2020Apr15]. Available from: <https://www.omicsonline.org/open-access/immune-response-against-bacterial-lipopolysaccharide-.php?aid=76866>
37. Todar K, Madison. Bacterial Endotoxin [Internet]. Online Textbook of Bacteriology. [cited 2020Apr10]. Available from: <http://textbookofbacteriology.net/endotoxin.html>
38. Броварська ОС, Варбанець ЛД, Ліханов АФ. Характеристика ліпополісахариду *Pseudomonas putida*. Мікробіол журн. 2020;82(1):23–32.
39. Варбанець ЛД, Здоровенко ГМ, Книрель ЮА. Методи дослідження ендотоксинів. Київ: Наукова думка; 2006. 238 с.
40. Пати́ка ВП, Пасі́чник ЛА, Гвоздяк РІ, Петри́чко ВФ, Корнійчук ОВ та ін. Фітопатогенні бактерії. Методи досліджень. Київ; 2017. 432 с.
41. Вестфаль О, Янн К. Бактериальные липополисахариды. Методы исследования углеводов. Москва: Мир; 1975. 325-333 с.
42. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. The Journal of Biological Chemistry. 1951May28;(193):265–75.
43. Спирин АС. Определение нуклеиновых кислот. Биохимия. 1958;23(5):562-662 с.
44. Варбанець ЛД, Борзова НД. Глікозидази мікроорганізмів та методи їх дослідження. Київ: Наукова думка; 2010.
45. Броварська ОС. Ліпополіцукриди та позаклітинні глікополімери *Ralstonia solanacearum*: склад, структура і біологічна активність [дисертація]. Київ: Інст. мікр. та вір.; 2007. 153 с.
46. Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PA, Smith F. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. Analytical Chemistry. 1956;28(3):350–6.

47. Ouchterlony Ö. Diffusion-In-Gel Methods for Immunological Analysis II (Part 1 of 4). Progress in Allergy Vol 6 Chemical Immunology and Allergy. 1962;6:30–65.
48. Броварская ОС, Варбанец ЛД. Влияние метода выделения на состав и биологические свойства липополисахарида *Escherichia coli*. Мікробіологічний журнал. 2019;81(2):3–11.
49. Комкова ОП, Образцова АМ, Сидорова НА. Механизмы серологических реакций. Петрозаводск: ПГУ; 2006.
50. Варбанец ЛД, Здоровенко ЭА, Броварская ОС, Калиниченко СВ. Характеристика липополисахарида *Escherichia coli* 126. Микробиология. 2017;86(1):54–61.
51. Варбанец ЛД, Винарская НВ. Биологическая активность липополисахаридов (эндотоксинов) *Ralstonia solanacearum* [Интернет]. Magazine. Токсини мікроорганізмів; 2004 [цитовано 2020 Квіт 9]. Доступно: http://medved.kiev.ua/arhiv_mg/st_2004/04_1_7.htm