

Т.В. Булигіна¹, Л.Д. Варбанець¹, І.І. Сейфулліна², Н.В. Шматкова²

¹Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України,
вул. Академіка Заболотного, 154, Київ, 03143, Україна

²Одеський національний університет ім. І.І. Мечникова

ФУНКЦІОНАЛЬНА ТА БІОЛОГІЧНА АКТИВНІСТЬ ЛІПОПОЛІСАХАРИДІВ *PANTOEA AGGLOMERANS*

Хімічна ідентифікація препаратів ліпополісахаридів (ЛПС) показала, що вони характеризуються різним відносним виходом від 5,2 до 14,00 % в залежності від штаму. В досліджуваних препаратах був визначений доволі високий вміст вуглеводів – від 22 до 54 %, 2-кето-3-дезоксіоктонової кислоти (КДО) – від 0,39 до 2,22 % та гептоз – від 3,3 до 14,00 %. Аналіз жирнокислотного складу показав присутність жирних кислот, які містять у ланцюзі від 12 до 16 атомів вуглецю. Домінуючою в ліпідах А ЛПС всіх досліджуваних штамів була 3-ОН-С14:0. Оскільки всі досліджувані штами *Pantoea agglomerans* виявилися чутливими до дії поліміксину В, то можна зробити висновок, що ліпополісахариди, отримані з цих штамів, не містять у складі ліпиду А такий замісник, як 4-аміно-4-дезоксид-арабінозу. Одним із шляхів зміни функціональних і біологічних властивостей ліпополісахаридів є хімічна модифікація. Як модифікатори були використані комплекси германію(IV) та стануму(IV). При дослідженні серологічної активності та токсичності модифікованих ліпополісахаридів було встановлено, що деякі з них втратили як серологічну, так і токсичну активність. Виявлено, що усі досліджувані ліпополісахариди *P. agglomerans* знижували середній показник адгезії та індекс адгезивності. Чим вищою була концентрація ліпополісахариду *P. agglomerans* в реакційній суміші, тим менше відбувалося взаємодій між поверхневими структурами еритроцитів та клітинами *Escherichia coli*.

К л ю ч о в і с л о в а: *Pantoea agglomerans*, ліпополісахарид, поліміксин В, 4-аміно-4-дезоксид-арабіноза, хімічна модифікація, адгезія, комплексні сполуки з германієм(IV) та станумом(IV).

На сьогодні, рід *Pantoea* включає в себе сім видів і два підвиди, серед яких одним із найбільш перспективних агентів біологічного контролю бактеріальних та грибкових захворювань рослин (особливо бактеріального опіку яблунь і груш) є вид *Pantoea agglomerans* [10]. Відомо [18], що його представники постійно потрапляють разом з рослинною їжею і кормами у шлунково-кишковий тракт людини і сільськогосподарських тварин, але при цьому не викликають патологічних реакцій.

Протягом дослідження виду *P. agglomerans* дослідники декілька разів змінювали систематичну назву даної бактерії. Так, деякий час її відносили до групи «herbicola» роду *Erwinia*. Причому вид *E. herbicola* ототожнювався із *Enterobacter agglomerans*. Але пізніше і *Erwinia*, і *Enterobacter* були віднесені до різних родів родини *Enterobacteriaceae* і вже у сучасній систематиці представників *E. herbicola* та *E. agglomerans* знову об'єднують в один вид *P. agglomerans* [12]. Оскільки цей вид є досить гетерогенним, необхідні подальші дослідження його представників з метою уточнення їх таксономічного положення.

Відомо [3], що одним з визнаних хемотаксономічних критеріїв

грамнегативних бактерій є структурні особливості їх ліпополісахаридів (ЛПС) – основних компонентів зовнішньої мембрани. Поряд з цим, висока імуномодуюча активність ЛПС дозволяє використовувати їх при створенні нових лікарських засобів. Однак, складність впровадження до терапевтичної практики ЛПС значною мірою обумовлена їх високою токсичністю та пірогенністю, а також недостатністю або непостійністю їх стимулюючого ефекту [13]. В останні роки розроблено декілька хімічних методів детоксикації, які дозволили одержати нетоксичні похідні (аналоги) ЛПС і з успіхом застосувати їх при конструюванні вакцин нового покоління [17]. Хімічна детоксикація дозволяє отримати деривати, які зберігають всі позитивні властивості ЛПС (ад'ювантність, індукцію синтезу цитокінів, активацію макрофагів та ін.) та позбавлені при цьому пірогенності та токсичності [11].

Тому метою роботи було дослідити функціональну та біологічну активність ліпополісахаридів, нативних та модифікованих координаційними сполуками стануму(IV) та германію(IV) з ароїл- та піридиноїлгідрозонами диметиламінобензальдегіду.

Матеріали і методи. Об'єктами досліджень були 7 штамів *Pantoea agglomerans* із колекції відділу фітопатогенних бактерій ІМВ НАН України, які були виділені з різних рослин-хазяїв та різних географічних зон (табл. 1).

Таблиця 1

Джерела виділення штамів *P. agglomerans*

Штам:	Рослина-хазяїн та місце виділення
7960a	Томати, Умань (Україна)
7969	Яблуна, Мінськ (Беларусь)
8456, 8488, 8490	Насіння вівса (Румунія)
8606	Бавовна, Санкт-Петербург (Росія)
8674г	Рослина-хазяїн не відома (Бельгія)

Бактерії вирощували на картопляному агарі у матрацах (періодичне культивування) протягом 36 год при 28–30 °С. Клітини змивали 0,9 % розчином NaCl, збирали центрифугуванням (5000 g, 20 хв) та висушували обробкою ацетоном та ефіром.

ЛПС екстрагували з висушених клітин 45 %-м водним розчином фенолу при 65–68 °С. Одержані водні фракції діалізували проти водопровідної, а потім дистильованої води для видалення фенолу [2]. ЛПС очищали від нуклеїнових кислот ультрацентрифугуванням (104000 g, 4 год), а також їх осадженням 50 %-м розчином трихлороцтової кислоти (ТХО).

Визначення кількості вуглеводів здійснювали за Dubois et al. [2]. У присутності сірчаної кислоти та фенолу, сахари та їх похідні набувають жовто-коричневого забарвлення, що використовується для їх кількісного визначення. Вміст вуглеводів визначали на спектрофотометрі СФ-26 при 490 нм, у відповідності зі стандартними кривими, які попередньо будували за глюкозою.

Визначення вмісту білка проводили згідно методу Lowry et al. [2] з використанням реактиву Фоліна. Метод ґрунтується на утворенні

фарбованих продуктів ароматичних амінокислот з реактивом Фоліна у поєднанні з біуретовою реакцією на пептидні зв'язки.

Чутливість мікробних культур досліджуваних штамів *P. agglomerans* до поліміксину В визначали диско-дифузійним методом [15], який заснований на здатності антибактеріального препарату дифундувати з просочених ним паперових дисків у живильне середовище, пригнічуючи ріст мікроорганізмів, посіяних на поверхні агару.

Хімічну модифікацію ЛПС проводили за методикою [3], використовуючи комплекси стануму(IV) з бідентатно координованими ароїл- та піридиноілгідрозонами диметиламінобензальдегіду (1–8), які відрізняються між собою гідразидним фрагментом, та комплекси стануму(IV) (11–18) і германію(IV) (9, 10, 19, 20) з відповідними тридентатно координованими гідрозонами 2-гідроксибензальдегіду, гідразидний фрагмент в яких повторюється при переході від бідентатних до тридентатних гідразонів (табл. 2). Вихідні комплекси синтезовані на кафедрі загальної хімії Одеського національного університету ім. І.І. Мечникова взаємодією R-бензоїлгідразонів (R = H, 2-OH, 2-OCH₃, 2-NH₂), R, R'-бензоїлгідразонів (R = 3-Br, R' = 5-OH), нікотиноїл-, ізо-нікотиноїлгідразонів 4-N(CH₃)₂- бензойного (R-HBdb, 3-Br-5-OH- HBdb, HNdb, Hldb відповідно) та 2-OH-бензойного альдегідів (R-H₂Bs, 3-Br-5-OH-H₂Bs, H₂Ns, H₂Is відповідно) з тетрахлоридами стануму та германію за методиками [6, 8, 9] і всебічно охарактеризовані сукупністю сучасних методів дослідження, зокрема, і рентгено-структурним аналізом (2, 7–10–11, 15, 17).

Токсичну дію нативних та хімічно модифікованих ЛПС вивчали на безпородних білих мишах при внутрішньочеревному введенні

Таблиця 2

Формули та схеми будови модифікуючих комплексів стануму(IV) та германію(IV) з гідрозонами

№	Формула комплексу	Схема будови комплексів	№	Формула комплексу	Схема будови комплексів
1	[SnCl ₄ (Bdb×H)]		11	[SnCl ₃ (HBs)]	
2	[SnCl ₄ (2-OH-Bdb×H)]		12	[SnCl ₃ (2-OH-HBs)]	
3	[SnCl ₄ (2-OH-5-Br-Bdb×H)]		13	[SnCl ₃ (2-OH-5-Br-HBs)]	

4	$[\text{SnCl}_4(2\text{-OCH}_3\text{-Bdb}\times\text{H})]$		14	$[\text{SnCl}_3(2\text{-OCH}_3\text{-HBs})]$	
5	$[\text{SnCl}_4(2\text{-NH}_2\text{-Bdb}\times\text{H})]$		15	$[\text{SnCl}_3(2\text{-NH}_2\text{-Bs}\times\text{H})]$	
6	$[\text{SnCl}_4(\text{Ndb}\times\text{H})]$		16	$[\text{SnCl}_3(\text{Ns}\times\text{H})]$	
7	$[\text{SnCl}_4(\text{ldb}\times\text{H})]$		17	$[\text{SnCl}_3(\text{Is}\times\text{H})]$	
8	$[\text{SnCl}_4(\text{Ldb}\times\text{H})]$		18	$[\text{SnCl}_3(\text{HLs})]$	
9	$[\text{Ge}(2\text{-OH-Bs})_2]$		19	$[\text{Ge}(\text{Ns})_2]$	
10	$[\text{Ge}(2\text{-NH}_2\text{-Bs})_2]$		20	$[\text{Ge}(\text{Is})_2]$	

серії розведень ЛПС. Модифіковані комплексами 1–20 препарати ліпополісахаридів вводили внутрішньочеревно білим мишам у концентрації ЛД₅₀. Визначали дозу препарату, що викликала загибель 50 % дослідних тварин (ЛД₅₀), яку використовували для оцінки токсичності ЛПС [2].

Імунохімічні властивості модифікованих ЛПС вивчали, застосовуючи метод подвійної імунодифузії в агарі за Оухтерлоні.

Антисироватки до прогрітих протягом 2,5 год при 100 °С культур *P. agglomerans* отримували шляхом трьох внутрішньовенних ін'єкцій кролям зростаючими дозами суспензії мікробних тіл з інтервалом між ін'єкціями 5 діб. Кров у тварин відбирали на сьомий день після останньої імунізації [2]. Вплив різних концентрацій ЛПС *P. agglomerans* на адгезію клітин *E. coli* до нативних еритроцитів кроля досліджували розгорнутим методом Бріліса та співавт. і виражали в індексах адгезивності (ІАМ) [1].

Статистичний аналіз проводили за загальноприйнятими методами варіаційної статистики [5]. Вірогідність різниці між контрольними та дослідними вимірами оцінювали використовуючи t-критерій Ст'юдента. Вірогідною вважали різницю між порівнюваними показниками при $p < 0,05$. Всі отримані дані статистично обробляли з використанням комп'ютерної програми MS Excel.

Результати та їх обговорення. Показано, що вихід ЛПС *P. agglomerans* складав від 5,2 до 14,0 % в залежності від штаму. Хімічна ідентифікація показала, що досліджувані препарати ЛПС характеризуються доволі високим вмістом вуглеводів – від 22 до 54 %, слідовими кількостями білка, у той час як вміст нуклеїнових кислот варіював у залежності від штаму (1,08 – 16,8 %). Ідентифіковані також 2-кето-3-дезоксіоктонова кислота (КДО) – від 0,39 до 2,22 % та гептози – від 3,3 до 14,00 %, які є характерними компонентами молекули ліпополісахариду (табл. 3).

Відомо, що в залежності від будови ліпиду А бактерії можуть бути чутливими або стійкими до таких поліпептидних антибіотиків як

Таблиця 3

Хімічна характеристика ліпополісахаридів *P. agglomerans*

Компоненти, (% до сухої маси препарату)	Штам:						
	7960a	7969	8456	8488	8490	8606	8674 тип.
Вуглеводи	32±1,6	54±0,2	24±1,2	42±2,1	22±1,1	48±2,4	53±1,65
Білок	сліди	Сліди	сліди	сліди	сліди	сліди	сліди
Нуклеїнові кислоти	1,08± 0,05	2,98± 0,15	2,40± 0,12	3,39± 0,2	16,80± 0,84	9,50± 0,48	7,73± 0,39
КДО	2,22± 0,11	0,52± 0,02	1,59± 0,08	0,82± 0,04	0,68± 0,03	1,34± 0,07	0,39± 0,02
Гептози	6,20± 0,31	7,20± 0,36	11,40± 0,57	7,40± 0,37	14±0,7	8,50± 0,425	3,3± 0,17
Вихід ЛПС	5,92± 0,3	9,50± 0,48	14±0,7	10,9± 0,55	5,2± 0,26	8,4± 0,42	6,84± 0,34

поліміксин В, амінокислоти (фенілаланін та лейцин) якого взаємодіють із ліпідом А за допомогою гідрофобних зв'язків. Крім того, фосфатні групи ліпиду А, маючи негативний заряд, взаємодіють із аміногрупами поліміксину В завдяки йонним зв'язкам [20]. Але в ліпідах А деяких бактерій можуть бути присутні замісники, які змінюють біологічні властивості не тільки ліпополісахаридів, але й всієї бактеріальної клітини [14, 19]. Зокрема при наявності 4-аміно-4-дезоксид-арабінози в молекулі ліпиду А, клітини бактерій є резистентними до поліміксину В.

Оскільки всі 7 досліджених штамів *P. agglomerans* виявилися чутливими до дії поліміксину В, що відображається у значних зонах затримки росту (44–66 мм) (рис. 1), можна припустити, що ліпополісахариди, отримані з цих штамів, не містять у складі ліпиду А такий замісник як 4-аміно-4-дезоксi-L-арабінозу, тому поліміксин В має можливість приєднуватись до молекули глюкозаміну.

Відомо, що ЛПС грамнегативних бактерій характеризуються високою імунологічною, радіопротекторною та протиухлинною активністю, що

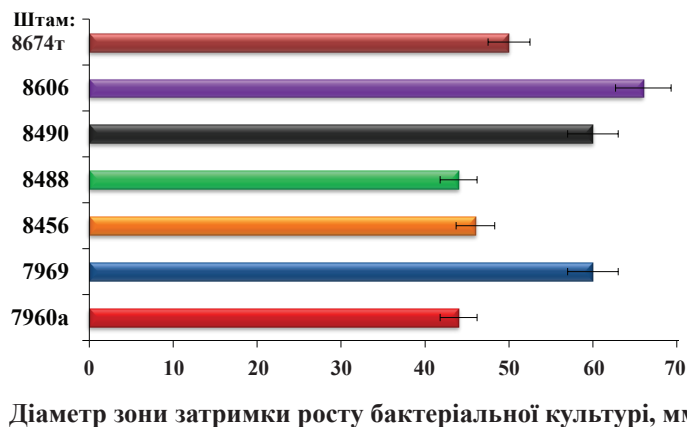


Рис. 1. Чутливість мікробних культур досліджуваних штамів *P. agglomerans* до поліміксину В

дозволяє розглядати їх як потенційну основу високоактивних лікувальних і профілактичних препаратів. Головною перешкодою для такого застосування ліпополісахаридів є їх висока ендотоксичність. Це спонукає дослідників розробляти підходи до отримання хімічно модифікованих ліпополісахаридів з меншою токсичністю і пірогенністю, але які б зберігали свої терапевтичні ефекти.

Досліджувані препарати ЛПС двох штамів проявили різний рівень токсичної активності, що відображено у показниках LD_{50} (табл. 4). Більш токсичним, ніж ліпополісахарид *P. agglomerans* 8488 ($LD_{50} = 420,45$ мкг/мишу) виявився ліпополісахарид *P. agglomerans* 7969 ($LD_{50} = 250$ мкг/мишу).

Комплексні сполуки германію(IV) та стануму(IV) по-різному впливали на токсичність нативних ЛПС (табл. 4). Із 20 досліджуваних сполук 3 комплекси германію(IV) та 12 комплексів стануму(IV), у тому числі всі комплекси Sn(IV) з тридентатною координацією гідразону, знижували токсичність модифікованого ЛПС *P. agglomerans* 7969. При цьому тільки одна комплексна сполука $[SnCl_4(Idb \cdot H)]$ підвищувала токсичну активність. Слід зазначити, що склад і будова молекул комплексів $[SnCl_4(Ndb \cdot H)]$ та $[SnCl_4(Idb \cdot H)]$ (табл. 2) однакові, вони відрізняються тільки положенням нітрогену в кільці піридину (3-N та 4-N відповідно). Можна зробити висновок, що саме це впливає на підвищення токсичності модифікованого ЛПС. Подібне спостерігається і на прикладі комплексів $[Ge(Ns)_2]$, $[Ge(Is)_2]$, які знижували токсичність ЛПС *P. agglomerans* 7969.

Результати порівняння токсичності нативних і модифікованих ЛПС *P. agglomerans* 8488 (табл. 4) свідчать, що внаслідок модифікації ЛПС

Таблиця 4

**Токсична активність нативних та модифікованих комплексами
Ge(IV) та Sn(IV) ЛПС штамів *P. agglomerans***

Штам:	Препарати ЛПС	Токсичність		Препарати ЛПС	Токсичність	
		Доза ЛПС, мкг/мишу	Летальність тварин, %		Доза ЛПС, мкг/мишу	Летальність тварин, %
7969	Нативний	250	50	Нативний	250	50
	Модифіковані комплексами:			Модифіковані комплексами:		
	[SnCl ₄ (Bdb·H)]	250	50	[SnCl ₃ (HBs)]	250	всі живі
	[SnCl ₄ (2-OH-Bdb·H)]	250	всі живі	[SnCl ₃ (2-OH-HBs)]	250	всі живі
	[SnCl ₄ (2-OH-5-Br-Bdb·H)]	250	всі живі	[SnCl ₃ (2-OH-5-Br-HBs)]	250	всі живі
	[SnCl ₄ (2-OCH ₃ -Bdb·H)]	250	всі живі	[SnCl ₃ (2-OCH ₃ -HBs)]	250	всі живі
	[SnCl ₄ (2-NH ₂ -Bdb·H)]	250	всі живі	[SnCl ₃ (2-NH ₂ -Bs·H)]	250	всі живі
	[SnCl ₄ (Ndb·H)]	250	50	[SnCl ₃ (Ns·H)]	250	всі живі
	[SnCl ₄ (Idb·H)]	250	50	[SnCl ₃ (Is·H)]	250	всі живі
	[SnCl ₄ (Ldb·H)]	250	50	[SnCl ₃ (HLs)]	250	всі живі
	[Ge(2-OH-Bs) ₂]	250	всі живі	[Ge(Ns) ₂]	250	всі живі
	[Ge(2-NH ₂ -Bs) ₂]	250	100	[Ge(Is) ₂]	250	всі живі
8488	Нативний	420,45	50	Нативний	420,45	50
	Модифіковані комплексами:			Модифіковані комплексами:		
	[SnCl ₄ (Bdb·H)]	420,45	50	[SnCl ₃ (HBs)]	420,45	всі живі
	[SnCl ₄ (2-OH-Bdb·H)]	420,45	50	[SnCl ₃ (2-OH-HBs)]	420,45	50
	[SnCl ₄ (2-OH-5-Br-Bdb·H)]	420,45	всі живі	[SnCl ₃ (2-OH-5-Br-HBs)]	420,45	всі живі
	[SnCl ₄ (2-OCH ₃ -Bdb·H)]	420,45	50	[SnCl ₃ (2-OCH ₃ -HBs)]	420,45	50
	[SnCl ₄ (2-NH ₂ -Bdb·H)]	420,45	100	[SnCl ₃ (2-NH ₂ -Bs·H)]	420,45	всі живі
	[SnCl ₄ (Ndb·H)]	420,45	всі живі	[SnCl ₃ (Ns·H)]	420,45	50
	[SnCl ₄ (Idb·H)]	420,45	всі живі	[SnCl ₃ (Is·H)]	420,45	50
	[SnCl ₄ (Ldb·H)]	420,45	100	[SnCl ₃ (HLs)]	420,45	50
	[Ge(2-OH-Bs) ₂]	420,45	всі живі	[Ge(Ns) ₂]	420,45	50
	[Ge(2-NH ₂ -Bs) ₂]	420,45	100	[Ge(Is) ₂]	420,45	всі живі

комплексами стануму [SnCl₄(2-OH-5-Br-Bdb×H)], [SnCl₄(Ndb×H)], [SnCl₄(Idb×H)], [SnCl₃(HBs)], [SnCl₃(2-OH-5-Br-HBs)], [SnCl₃(2-NH₂-Bs×H)] та комплексами германію [Ge(2-OH-Bs)₂], [Ge(Is)₂] спостерігається зниження рівня токсичності досліджуваного ЛПС. Поряд з цим 3 модифікованих зразка з [SnCl₄(2-NH₂-Bdb×H)], [SnCl₄(Ldb×H)], [Ge(2-NH₂-Bs)₂] підвищували його токсичність. Зафіксовано, що наявність

різних замісників (2-ОН, 2-ОН-5-Br, 2-ОСН₃, 2-НН₂) у молекулах гідразонів, однаково тридентатно координованих до Sn(IV) в комплексах 12–15, обумовлює прояв різної токсичності модифікованого ЛПС *P. agglomerans* 8488. При цьому комплекси [SnCl₃(2-ОН-5-Br-НВs)], [SnCl₃(2-НН₂-Вs×Н)], незалежно від штаму, повністю пригнічували токсичність модифікованих ЛПС. Слід зазначити, що різна дія комплексів, які було використано для модифікації ЛПС, може бути обумовлена не тільки структурними особливостями комплексних сполук, але й ліпідів А ЛПС різних штамів *P. agglomerans*.

Наведені вище дані свідчать про те, що більшість досліджуваних комплексів виявились досить ефективними модуляторами токсичності ЛПС. Вірогідно це пов'язано взагалі з властивостями комплексів біоактивних металів з гідразонами, які, як відомо з літератури [16], володіють протимікробною, протипухлинною, протизапальною активністю, що обумовлено наявністю в їх структурі аналога пептидної групи С(О)НН. Найбільш активні комплекси з гідразонами за ефективністю протимікробної дії наближаються до антибіотика тетрацикліну. Протипухлинна активність по відношенню до деяких видів злоякісних пухлин як *in vitro*, так і *in vivo* подібна до дії препаратів дихлородіамміноплатину (II) (ДДП (VIII)) та тіофосфаміду (ТІО-ТЕФ (IX)), які застосовуються в клініці [4].

Досліджені координаційні сполуки Ge(IV) з гідразонами відносяться до однорідно-, а Sn(IV) до змішанолігандних. При цьому в комплексах Ge(IV) ліганди координуються тридентатно-циклічно, а для Sn(IV) спостерігається як бі-, так і тридентатна їх координація. Привертає увагу те, що всі (крім [Ge(2-НН₂-Вs)₂]) комплекси з тридентатно координованими гідразонами, незалежно від комплексоутворювача (Ge(IV) чи Sn(IV)), не підвищують токсичність модифікованих ЛПС, а навпаки, більшість з них знижують її. При наявності однакового способу координації ліганду, останнє залежить від складу комплексів, особливо від наявності у молекулах гідразонів різних замісників, здатних утворювати супрамолекулярні ансамблі за рахунок водневих зв'язків з функціональними групами (ОН-, СООН-, НРО₄²⁻) ліпиду А ЛПС. Відомо, що водневий зв'язок визначає загальну форму багатьох білків, розпізнавання субстратів ферментів та структуру ДНК [7]. Завдяки спрямованості і достатній силі він вважається «ключовою взаємодією» в супрамолекулярній хімії, в результаті якої відбувається розупорядкування структури модифікованого ЛПС, внаслідок чого він втрачає свою «ендотоксичну» конформацію.

Якщо ліпід А відповідає за більшість видів біологічної активності молекули ліпополісахариду, то серологічну специфічність мікробної клітини визначають особливості компонентного складу і структури О-специфічного полісахариду. Можна припустити, що комплексні сполуки германію(IV) та стануму(IV) здатні взаємодіяти з функціональними групами О-специфічного полісахариду, таким чином, змінюючи їх активність.

При проведенні реакції подвійної імунодифузії в агарі за Оухтерлоні, виявлено, що деякі комплексні сполуки стануму [SnCl₄(2-НН₂-Вdb×Н)],

[$\text{SnCl}_4(\text{Idb} \times \text{H})$] та [$\text{SnCl}_3(2\text{-NH}_2\text{-Bs} \times \text{H})$] мали інгібуючий вплив (рис. 2), тобто можна припустити, що відбулося екранування антигенної детермінанти. Цікавим фактом є дуга, яка утворилася навколо лунки з антигеном. Дану дугу називають лінією ідентичності. Це свідчить про ідентичність антигенів у сусідніх лунках (ідентичність модифікованого ЛПС *P. agglomerans* 7969 комплексом [$\text{SnCl}_3(2\text{-OCH}_3\text{-HBs})$] з контролем та модифікованим ЛПС *P. agglomerans* 7969 комплексом [$\text{SnCl}_3(2\text{-OH-5-Br-HBs})$]). Крім цього при модифікації ЛПС комплексними сполуками стануму [$\text{SnCl}_3(2\text{-NH}_2\text{-Bs} \times \text{H})$] та [$\text{SnCl}_3(2\text{-OH-HBs})$] можна спостерігати дві лінії преципітації, що свідчить про наявність двох комплексів антиген-антитіло.

Оскільки відомо, що ліпополісахариди є основними факторами патогенності грамнегативних бактерій, то важливим є вивчення їх

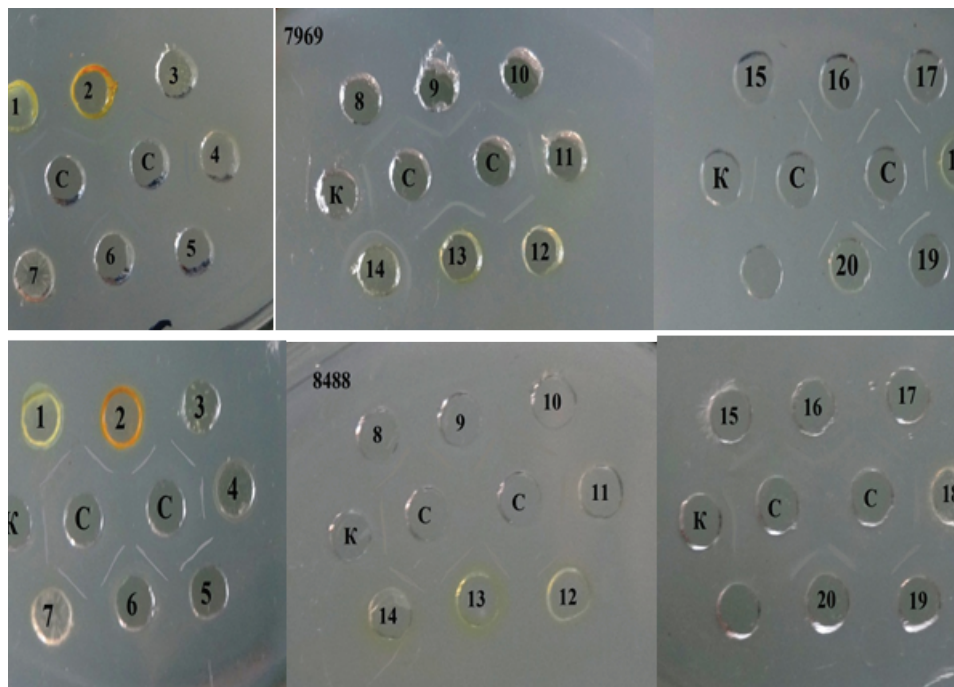


Рис. 2. Реакція подвійної імунодифузії в агарі за Оухтерлоні між модифікованими препаратами ліпополісахаридів і О-антисироватками до *P. agglomerans* 7969 та 8488. К – контроль, С – сироватка, 1-20 – ЛПС, модифіковані комплексними сполуками германію(IV) та стануму(IV)

здатності прикріплюватись до клітин завдяки адгезії. Виявлено, що усі досліджувані ліпополісахариди *P. agglomerans* знижували середній показник адгезії та індекс адгезивності: чим вища концентрація ліпополісахариду в реакційній суміші, тим менше відбувалося взаємодій між поверхневими структурами еритроцитів та клітинами *E. coli* (рис. 3, 4).

Найбільше інгібування адгезії спостерігалось під впливом ліпополісахаридів *P. agglomerans* 7969, 8456 та 8606, які в концентрації 3 мг/мл знижували середню кількість клітин *E. coli* на одному еритроциті, задіяному в адгезивному процесі (ІАМ складав 1,6, 1,7, та 1,65 відповід-

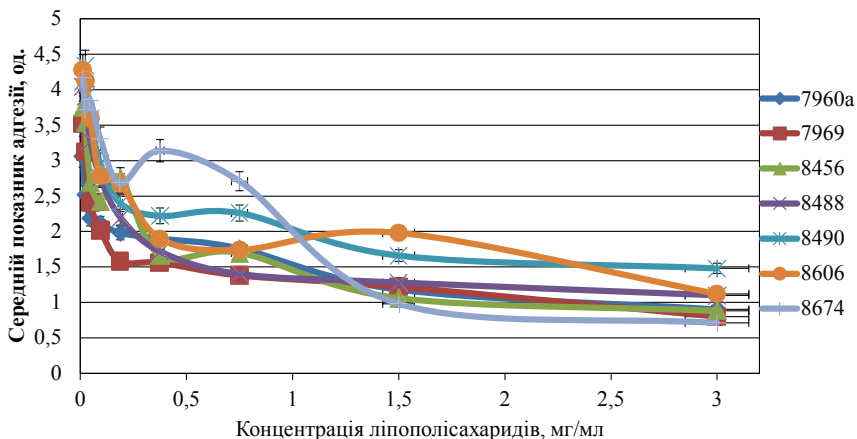


Рис. 3. Вплив різних концентрацій ліпополісахаридів *P. agglomerans* на середній показник адгезії *E. coli*

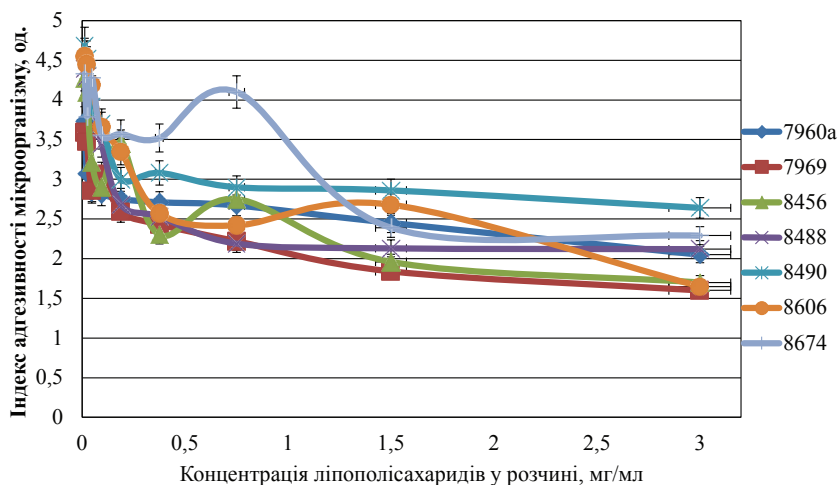


Рис. 4. Вплив різних концентрацій ліпополісахаридів *P. agglomerans* на індекс адгезивності *E. coli*

но). Вплив ліпополісахариду *P. agglomerans* 8490 на процес адгезії був найменшим: ІАМ в максимально досліджуваній концентрації складав 2,64. Всі інші ліпополісахариди при концентрації в реакційній суміші 3 мг/мл виявили приблизно однакову здатність до інгібування: показник ІАМ був близько 2,2.

Таким чином, вперше виділено і хімічно охарактеризовано ліпополісахариди 7-ми штамів *Pantoea agglomerans*, які ізолювані із різних рослин. Оскільки всі штами виявилися чутливими до дії поліміксину В, то можна припустити, що у складі ліпиду А ліпополісахаридів досліджуваних штамів *P. agglomerans* відсутня 4-аміно-4-дезоксид-арабіноза. Показано, що досліджувані комплексні сполуки германію(IV) та стануму(IV) здатні взаємодіяти з певними хімічними групами ліпідів А ЛПС *P. agglomerans*, що призводить до зміни їх токсичності. Одержані нетоксичні форми можуть бути використані при розробці препаратів терапевтичної дії. Крім цього, здатність комплексних сполук взаємодіяти з певними хімічними

групами О-специфічного полісахариду приводила до зміни серологічної специфічності бактеріальної клітини. ЛПС *P. agglomerans* знижували кількість адгезованих клітин *E. coli* на еритроцитах кроля шляхом конкуренції за зв'язування з їх поверхневими структурами.

Автори висловлюють щиру подяку Наталії Всеволодівні Житкевич за надані для досліджень штами *Pantoea agglomerans* з колекції музею відділу фітопатогенних бактерій ІМВ НАН України.

Т.В. Булыгина¹, Л.Д. Варбанец¹, И.И. Сейфуллина², Н.В. Шматкова²

¹Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины

²Одесский национальный университет им. И.И. Мечникова

ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ И БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ЛИПОПОЛИСАХАРИДОВ *PANTOEA AGGLOMERANS*

Резюме

Химическая идентификация препаратов липополисахаридов (ЛПС) показала, что они характеризуются различным относительным выходом от 5,2 до 14,00 % в зависимости от штамма. В исследуемых препаратах было определено достаточно высокое содержание углеводов – от 22 до 54 %, 2-кето-3-дезоксиктоновой кислоты (КДО) – от 0,39 до 2,22 % и гептозы – от 3,3 до 14,00 %. Анализ жирнокислотного состава показал присутствие жирных кислот, которые содержат в цепи от 12 до 16 атомов углерода. Доминирующей в липидах А ЛПС всех исследуемых штаммов была 3-ОН-С14:0. Поскольку все исследуемые штаммы *Pantoea agglomerans* оказались чувствительными к действию полимиксина В, то можно сделать вывод, что ЛПС, полученные из этих штаммов, не содержат в составе липида А такой заместитель как 4-амино-4-дезоксид-арабинозы. Одним из путей изменения функциональных и биологических свойств ЛПС является химическая модификация. Как модификаторы были использованы комплексы германия и олова. При исследовании серологической активности и токсичности модифицированных ЛПС было установлено, что некоторые из них потеряли как серологическую, так и токсическую активность. Выявлено, что все исследуемые ЛПС *P. agglomerans* снижали средний показатель адгезии и индекс адгезивности. Чем выше концентрация ЛПС *P. agglomerans* в реакционной смеси, тем меньше происходило взаимодействий между поверхностными структурами эритроцитов и клетками *E. coli*.

К л ю ч е в ы е с л о в а: *Pantoea agglomerans*, липополисахарид, полимиксин В, 4-амино-4-дезоксид-арабиноза, химическая модификация, адгезия, комплексные соединения с германием (IV) и станумом (IV).

T.V. Bulyhina¹, L.D. Varbanets¹, I.I. Seyfullina², N.V. Shmatkova²

¹Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, NAS of Ukraine,
154 Acad. Zabolotny St., Kyiv, 03143, Ukraine

²Odessa I.I. Mechnikov National University

FUNCTIONAL AND BIOLOGICAL ACTIVITY OF *PANTOEA AGGLOMERANS* LIPOPOLYSACCHARIDES

Summary

The lipopolysaccharides (LPS) of the seven strains of *Pantoea agglomerans* were isolated and chemically identified. It was established that the investigated strains characterized by different relative output of LPS from 5.2 to 14.0 % by dry weight of bacteria. LPS were characterized quite high content of carbohydrates - from 22 to 54 %, 2-keto-3-deoxyoctonic acid (KDO) – from 0.39 to 2.22 % and heptose – from 3.3 to 14.00 %. Fatty acids, containing in the chain of 12 to 16 carbon atoms were identified. Lipids A of all tested LPS were characterized by predominant 3-OH-C14:0 acid from 31.7 to 39.3 % depending on the strain. Since all the studied strains of *P. agglomerans* were sensitive to polymyxin B, it can be concluded that the LPS do not contain in the structure of lipid A, such a substitute as 4-amino-4-deoxy-L-arabinose. One of the ways of changes in the functional and biological properties of LPS is the chemical modification. As modifiers were used complexes of germanium and tin. In the study of serological activity and toxicity of modified LPS it was found that some of them lost both serological and toxic activity. It was revealed that all investigated *P. agglomerans* LPS decreased the median adhesion and the index of the adhesiveness. The higher concentration of *P. agglomerans* LPS in the reaction mixture, the less interactions between surface structures of red blood cells and E.coli cells.

Key words: *Pantoea agglomerans*, lipopolysaccharide, polymyxin B, 4-amino-4-deoxy-L-arabinose, chemical modification, adhesion, complex compounds of germanium (IV) and Tin (IV).

1. Брилис В.И., Брилине Т.А., Ленцнер Х.П., Ленцнер А.А. Методика изучения адгезивного процесса микроорганизмов // Лабораторное дело. – 1986. – № 4 – С. 210–212.
2. Варбанец Л.Д., Здоровенко Г.М., Книрель Ю.А. Методы исследования эндотоксинов. – К.: Наукова думка, 2006. – 238 с.
3. Варбанец Л.Д., Шубчинський В.В., Похил С.І, Сейфулліна І.Й., Шматкова Н.В., Самбурський С.Е. Біологічна активність нативних і модифікованих ліпополісахаридів *Pragia fontium* // Укр. біохімічний журнал. – 2009. –Т. 81 – № 1 – С. 31–40.
4. Зеленин К.Н. Физиологически активные комплексы гидразонов // Соросовский образовательный журнал. – 1996. – № 12 – С. 41–46.
5. Ланкин Г.Ф. Биометрия. – М.: Высшая школа, 1980. – 293 с.
6. Сейфуллина И., Шматкова Н.В., Старикова З.А. О комплексообразовании GeCl_4 с салицилальгидразами b- и g-пиридинкарбоновых кислот (H_2Ns , H_2Is) в метаноле. Кристаллическая и молекулярная структура $[\text{GeCl}_2(\text{NsHCl})\text{CH}_3\text{OH}]\text{CH}_3\text{OH}$ // Журн. неорганической химии. – 2004. – Т. 49. – № 3 – С. 401–407.
7. Хан-Мари Лен. Супрамолекулярная химия. Концепции и перспективы. – Н.: Наука – 1998. – 332 с.
8. Шматкова Н.В., Сейфуллина И.И., Архипов Д.Е., Корлюков А.А. Хелаты тетраоксида олова с пиридинойгидразами 4-диметиламинобензальдегида. Молекулярная и кристаллическая структура $[\text{SnCl}_4(\gamma\text{-Idb}\times\text{H})] \times \text{CH}_3\text{CN}$ и $[\text{SnCl}_4(\gamma\text{-Idb}\times\text{H})] \times \text{DMF}$ // Коорд. химия. – 2015. – Т. 41 – № 8 – С. 467–473.
9. Шматкова Н.В. Продукты комплексобразования SnCl_4 с N,O-содержащими

- гидразидами и гидразонами // Технологический аудит и резервы производства. – 2012. – Т. 3 – № 2 (5) – С. 33–34.
10. Barash I., Manulis-Sasson S. Recent evolution of bacterial pathogens: the gall-forming *Pantoea agglomerans* case. // Annu Rev Phytopathol – 2009. – № 47 – P. 133–152.
 11. Carpati C.M. Monophosphoryl lipid A attenuates the effects of endotoxic shock in pigs // Journal of Laboratory and Clinical Medicine. – 1992. – V. 119 – № 4 – P. 346–353.
 12. Gavini F.J., Beji M.A., Mielcarek C., Izard D., Kerster K., De Ley J. Transfer of *Enterobacter agglomerans* (Beyerink 1888) Ewing and Fife 1972 to *Pantoea* gen. nov. as *Pantoea agglomerans* comb. nov. and description of *Pantoea dispersa* sp. nov. // Int. J. Syst. Bacteriol. – 1989. – V. 39, № 3 – P. 337–345.
 13. Kawa K. IFN-gamma is a master regulator of endotoxin shock syndrome in mice primed with heat-killed *Propionibacterium acnes* // International Immunology. – 2010. – V. 22 – № 3 – P. 157–166.
 14. Knirel Y.A., Dentovskaya S.V., Bystrova O.V. Relationship of the Lipopolisaccharide structure of *Yersinia pestis* to resistance to antimicrobial factors // Adv. Exp. Med. Biol. – 2007. – № 603 – P. 88–96.
 15. Methods for the determination of susceptibility of bacteria to antimicrobial agents. EUCAST Definitive document // Clin Microbiol Infect. – 1998. – V. 4 – P. 291–296.
 16. Rollas S., Guniz Kucukguzel S. Biological Activities of Hydrazone Derivatives. // Molecules. – 2007. – V. 12 – P. 1910–1939.
 17. Schneerson R. Evaluation of monophosphoryl lipid A (MPL) as an adjuvant. Enhancement of the serum antibody response in mice to polysaccharide-protein conjugates by concurrent injection with MPL // Journal of Immunology. – 1991. – № 147 – P. 2136–2140.
 18. Sergeeva E., Danielle H., Nelson, L.M. Production of indole-3-acetic acid, aromatic amino acid aminotransferase activities and plant growth promotion by *Pantoea agglomerans* rhizosphere isolates // Plant Soil. – 2007. – V. 297, № 1–2. – P. 1–13.
 19. Trent M.S. An inner membrane enzyme in *Salmonella* and *Escherichia coli* that transfers 4 – amino – 4 – deoxy – L – arabinose to lipid A: induction on polymyxin – resistant mutants and role of a novel lipid – linked donor // J. Biol. Chem. – 2001. – V. 276 – № 46 – P. 43122–43131.
 20. Vesentini S. et al. Multi-scale analysis of the toraymyxin adsorption cartridge. Part I: molecular interaction of polymyxin B with endotoxins. // Int J Artif Organs. – 2006. – V. 29 – P. 239–250.

Отримано 24.02.2016