

7. Kimoto H., Ohmoto S., Okamoto T. Cholesterol removal from media by *Lactococci* //J. Dairy Sci. – 2002. – **85**, N 12. – P. 3182–3188.
8. Noh D.O., Kim S.H., Gilliland S.E. Incorporation of cholesterol into the cellular membrane of *Lactobacillus acidophilus* ATCC 43121 //J. Dairy Sci. – 1997. – **80**, N12. – P. 3107–3113.
9. Psomas E.I., Fletouris D.J., Litopoulou-Tzanetaki E., Tzanetakis N. Assimilation of cholesterol by yeast strains isolated from infant feces and Feta cheese //J. Dairy Sci. – 2003. – **86**, N 11. – P. 3416–3422.
10. Sirilun S., Chaiyasut C., Kantachote D., Luxanani P. Characterization of non human origin probiotic *Lactobacillus plantarum* with cholesterol-lowering property //African Journal of Microbiology Research. – 2010. – **4**, N 10. – P. 994–1000.
11. Starovoitova S., Kishko K., Lazarenko L., Shynkarenko L., Spivak M., Nikolaychuk M. Cholesteraze activity of new lacto- and bifidobacteria strains *in vitro* //Науковий вісник Ужгородського університету. Серія Біологія. – 2010. – Вип. 27. – С. 1–4.

Отримано 16.05.2011

УДК 579.841.11.114

О.С. Броварская¹, Л.Д. Варбанец¹, С.И. Похил²

¹Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К.Заболотного НАН Украины,
ул. Академика Заболотного, 154, Киев ГСП, Д03680, Украина

²Институт микробиологии и иммунологии им. И.И. Мечникова АМН Украины,
61057 Харьков, ул. Пушкинская 14/16, Украина

БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ЛИПОПОЛИСАХАРИДОВ *BUDVICIA AQUATICA*

*Впервые изучен жирнокислотный состав липидов А липополисахаридов (ЛПС) 6 штаммов *Budvicia aquatica* – представителей нового вида *Enterobacteriaceae*. Установлено присутствие жирных кислот с длиной углеродной цепи от C₁₂ до C₁₈. Все исследуемые штаммы *B. aquatica* содержали 3-гидрокситетрадекановую кислоту (23,1-43,8 %, в зависимости от штамма), которая была доминирующей и характерна для семейства *Enterobacteriaceae*. ЛПС исследуемых штаммов проявляли токсичность и пирогенность.*

*Ключевые слова: *Budvicia aquatica*, липополисахарид, липид А, жирнокислотный состав, токсичность, пирогенность.*

Важным фактором патогенности грамотрицательных бактерий является липополисахарид (ЛПС) – специфический гликополимер, который входит в состав наружной мембраны клеточной оболочки грамотрицательных бактерий и вместе с белками формирует ее внешний слой. Находясь в тесном контакте с мембранными белками, ЛПС обеспечивают целостность, стабильность и функциональное предназначение наружной мембраны микробной клетки. В силу своего поверхностного расположения ЛПС играет важную роль во взаимоотношениях бактериальной клетки с окружающей средой, а в случае патогенных микроорганизмов – с организмом-хозяином, в отношении к которому он проявляет себя как О-антиген и эндотоксин. Многие патофизиологические проявления грамотрицательных инфекций, в том числе эндотоксемия и бактериальный шок, ассоциированы с уникальными эндотоксическими свойствами ЛПС. Среди широкого спектра биологической активности ЛПС особое внимание исследователей привлекают их токсичность и способность активировать клетки иммунной системы. Результатом специфического взаимодействия ЛПС с клетками макроорганизма является биосинтез активных медиаторов-цитокинов, которые при низкой концентрации регулируют работу иммунной системы организма, а при высокой – вызывают развитие сложной сети токсических эффектов, таких как пирогенность, лейкопения, септический шок.

Поскольку липид А ЛПС погружен во внешнюю мембрану клеток бактерий, вероятно, он проявляет свои токсические эффекты, когда освобождается из размножающихся клеток в растворимой форме или когда в результате аутолизиса, действия комплемента, фагоцитоза или определенного типа антибиотиков происходит лизис клеток.

© О.С. Броварская, Л.Д. Варбанец, С.И. Похил, 2012

ЛПС *Budvicia aquatica* были выделены нами ранее [1] и изучен их моносахаридный состав. Поскольку в литературе отсутствуют данные по изучению липидов А представителей этого вида, целью данной работы было изучить жирнокислотный состав липидов А, а также эндотоксическую активность, в частности токсичность и пирогенность, ЛПС некоторых представителей *B. aquatica*.

Материалы и методы. Объектами исследования служили 6 штаммов *B. aquatica*, выделенных из различных источников (табл. 1). Выращивание бактерий и выделение ЛПС описано ранее [1].

При изучении жирнокислотного состава навеску препарата (10 мг) растворяли в 3 мл 1,5 % раствора хлористого ацетила в метаноле (предварительно охлажденном) и гидролизовали при температуре 100 °С в запаянных ампулах в течение 4 час [3]. Метилловые эфиры жирных кислот экстрагировали трижды гексаном (по 3 мл). Фракцию н-гексана отбирали и высушивали на вакуумном испарителе. Анализ метиловых эфиров жирных кислот проводили на хромато-масс-спектрометрической системе Agilent 6890N/5973 inert. Колонка HP-5MS, длина 30 м, внутренний диаметр 0,25 мм, толщина фазы 0,25 мкм. Температурный режим 150-250 °С, градиент температуры 4 °С/мин, газ-носитель – гелий, скорость потока через колонку 1,2 мл/мин. Температура испарителя с разделением потока 1:100. Обработку результатов проводили с помощью персонального компьютера и стандартной смеси метиловых эфиров жирных кислот (Supelco, США).

Таблица 1

Источники выделения штаммов *B. aquatica*

Штаммы <i>B. aquatica</i> , коллекция	Источник выделения
DRL 20186 (типовой)	Вода из колодца, Чехия, Пражский институт гигиены и эпидемиологии
DRL 23270	Питьевая вода, Чехия, Пражский институт гигиены и эпидемиологии
DRL 24833	Питьевая вода, Чехия, Пражский институт гигиены и эпидемиологии
ЛНМИЗ 96U101	Вода р. Уды, Харьковская обл.
ЛНМИЗ 97U124	Выделения клинически здорового человека
ЛНМИЗ 97U126	Выделения клинически здорового человека

Примечание: DRL – Diagnostical and Research Laboratory, Budapest, Hungary; ЛНМИЗ – лаборатория новых и малоизученных инфекционных заболеваний Харьковского научно-исследовательского института микробиологии и иммунологии им. И.И. Мечникова

Токсичность изучали на белых беспородных мышах (15-20 г), сенсibilизированных D-галактозамингидрохлоридом. Раствор D-галактозамингидрохлорида (15 мг на мышь, 0,2 мл) и ЛПС (45-140 мкг, 0,2 мл) в изотоническом стерильном непирогенном физиологическом растворе вводили внутрибрюшинно группе мышей из 4 животных. Контрольной группе вводили вместе с D-галактозамингидрохлоридом 0,2 мл физиологического раствора. В серии разведений ЛПС определяли дозу препарата, которая вызывала гибель 50 % исследуемых животных (LD_{50}), которую использовали для оценки токсичности ЛПС. Наблюдения за животными проводили в течение 48 час [6].

Пирогенность ЛПС изучали на кроликах весом 2,0-3,5 кг [3]. Термометрию проводили в течение трех суток утром до кормления с помощью электронного термометра (“Omron Matsusaka Co. Ltd”, Япония), который вводили в прямую кишку на глубину 5-7 см (в зависимости от веса кролика). Всех кроликов предварительно испытывали на иммунореактивность путем внутривенного введения 10 мл/кг 0,9 %-ного стерильного непирогенного раствора хлорида натрия. Исследованные препараты ЛПС растворяли в стерильном непирогенном изотоническом физиологическом растворе, перед введением выдерживали в течение 10 мин при 37 °С, после чего внутривенно вводили из расчета 1 мл/кг веса животного. Минимальную пирогенную дозу препаратов ЛПС определяли в серии разведений от 0,5 до $1,0 \times 10^{-2}$ мг/мл. Каждую серию исследованных растворов проверяли на 3-х кроликах, близких по весу (которые отличались не более чем 0,5 кг). Перед введением раствора ЛПС у кроликов дважды измеряли температуру с интервалом 30 мин. Поскольку разница в показателях температуры не должна превышать 0,2 °С, животных, которые не отвечали этому показателю, для исследований не использовали. Результат последнего измерения принимали за исходную температуру. Раствор ЛПС вводили не позднее чем через 15-20 мин после последнего измерения темпера-

туры. Последующие измерения проводили после введения препарата трижды с промежутками в 1 час. Исследуемый раствор ЛПС считали непирогенным, если сумма повышений температур у 3-х кроликов была меньше или равнялась 1,4 °С. Если эта сумма превышала 2,2°С, то исследуемый раствор считали пирогенным. Эксперименты проводили в трех повторностях.

Результаты и их обсуждение. ЛПС представляют собой уникальный компонент бактериальной клетки, присущий исключительно грамотрицательным бактериям. С одной стороны, они вызывают серию патофизиологических реакций, в ряде случаев заканчивающихся летальным исходом, с другой – стимулируют факторы неспецифической резистентности макроорганизма. За эндотоксическую активность ЛПС ответственным является липид А. Он состоит из фосфорилированного димера глюкозамина, к которому присоединяется 6 или 7 остатков жирных кислот. Все жирные кислоты в липиде А являются насыщенными. Некоторые жирные кислоты присоединяются к димеру глюкозамина непосредственно, в то время как другие эстерифицируют 3-гидроксижирные кислоты, которые являются дифференцирующими для определенных видов бактерий.

Методом хромато-масс-спектрометрии метиловых эфиров жирных кислот ЛПС исследуемых штаммов *B. aquatica* установлено присутствие жирных кислот с длиной цепи от C₁₂ до C₁₈ (табл. 2). По качественному и количественному составу жирных кислот липиды А ЛПС исследованных штаммов в значительной степени отличаются между собой, что дает основание разделить их на две группы: к первой относятся штаммы (ЛНМИЗ 96U101 и DRL 23270), липиды А которых содержат 3-гидроксидекановую кислоту (6,6 и 10,1 %, соответственно), к другой – те, которые ее не содержат. В липидах А всех исследованных штаммов присутствует 3-гидрокситетрадекановая кислота (23,1-43,8 %), тетрадекановая (2,1-32,70 %), а также гексадекановая (6,3-27,1 %) (в зависимости от штамма).

Таблица 2

Жирнокислотный состав ЛПС *B. aquatica*

Кислота	<i>B. aquatica</i> штаммы:					
	DRL			ЛНМИЗ		
	20186	24833	23270	96U101	97U124	97U126
% к общей сумме площадей пиков						
C _{12:0}	8,4	15,5	-	-	12,2	-
3-ОН-C _{12:0}			10,1	6,6	-	-
C _{14:0}	32,7	21,9	2,1	6,9	14,7	16,1
iC _{15:0}	-	-	-	-	5,2	1,2
aiC _{15:0}	1,2	-	-	18,2	9,8	-
3-ОН-C _{14:0}	23,8	43,8	23,1	29,0	31,1	36,9
iC _{16:0}	-	-	-	-	0,9	-
C _{16:1}	20,4	10,5	25,3	0,7	6,5	16,0
C _{16:0}	11,8	6,3	27,1	10,4	17,3	23,1
iC _{17:0}	-	-	-	2,5	-	-
cis9,10-C _{17:0}	1,7	-	9,7	2,0	-	-
cisC _{18:1}	-	0,8	1,2		0,5	2,7
tC _{18:1}	-	0,8	1,4	0,7	-	2,5
C _{18:0}	-	0,4	-	23,0	1,6	1,5

Примечание: « - » не выявлено

Поскольку липид А является высококонсервативной частью молекулы ЛПС, его жирнокислотный состав может быть использован как дополнительный хемотаксономический критерий при дифференциации видов. Особенно постоянен он у представителей семейства *Enterobacteriaceae*, для которых характерным является присутствие лишь одной гидроксильной жирной кислоты – 3-окситетрадекановой, которая ацилирует как amino-, так и гидроксильные группы остатков глюкозамина липида А. И действительно, все исследуемые штаммы *B. aquatica* содержали 3-гидрокситетрадекановую кислоту, которая была доминирующей. Несколько неожиданным было обнаружение в липидах А некоторых штаммов *B. aquatica* 3-гидроксидекановой кислоты, которая является характерной для представителей различных видов *Pseudomonas*, но не *Enterobacteriaceae*.

Поскольку липиды А являются ответственными за эндотоксическую активность молекулы ЛПС, была изучена их токсичность и пирогенность.

Для оценки токсичности ЛПС исследуемых штаммов *B. aquatica* определяли дозу препарата ЛПС, при введении которой наблюдается 50 % гибель экспериментальных животных. Установлено (табл. 3), что штаммы (DRL 23270 и ЛНМИЗ 96U101), которые содержали 3-гидроксидодекановую кислоту (10,1 и 6,6 %, соответственно), а также незначительное количество тетрадекановой кислоты (2,1 и 6,6 %, соответственно) в дозе 140 мкг/мышь оказались не токсичными. Для остальных штаммов ЛД₅₀ составляло 120 мкг/мышь (DRL 24833) и 100 мкг/мышь (DRL 20186, ЛНМИЗ 97U124 и 97U126). Следует отметить, что полученные результаты свидетельствуют об относительно невысокой токсичности ЛПС *B. aquatica* по сравнению с другими представителями семейства *Enterobacteriaceae*, в частности *Rahnella aquatilis*, *Pragia fontium* и *Escherichia coli* [4, 5, 2].

Таблица 3

Токсичность ЛПС *B. aquatica*

Штамм	Вес мыши, г	Доза		ЛД ₅₀
		мкг/мышь	мг/кг	
DRL 20186	20	100,0	5,0	50%
DRL 23270	15	140,0	9,2	Все живые
DRL 24833	20	120,0	6,0	50%
ЛНМИЗ 96U101	20	140,0	7,0	Все живые
ЛНМИЗ 97U124	20	100,0	5,0	50%
ЛНМИЗ 97U126	20	100,0	5,0	50%

Для сравнительной оценки пирогенных свойств ЛПС *B. aquatica* была установлена минимальная пирогенная доза, которая составляла $7,5 \times 10^{-3}$ мкг/мл апиогенного изотонического раствора. Результаты термометрии показали, что повышение температуры у экспериментальных животных больше, чем на +0,45 °С, которое выходит за пределы физиологической нормы здоровых животных, вызывали растворы ЛПС *B. aquatica* DRL 23270, 20186, ЛНМИЗ 97U124 (рис. 1). Через час после введения ЛПС наблюдали резкое повышение температуры подопытных животных, через два часа – некоторое снижение температуры с тенденцией к ее нормализации. При внутривенном введении экспериментальным животным минимальной пирогенной дозы раствора ЛПС *B. aquatica* ЛНМИЗ 97U126 повышение температуры тела у животных не превышало +0,4 °С, что может свидетельствовать об отсутствии пирогенного действия ЛПС этого штамма в исследованной концентрации.

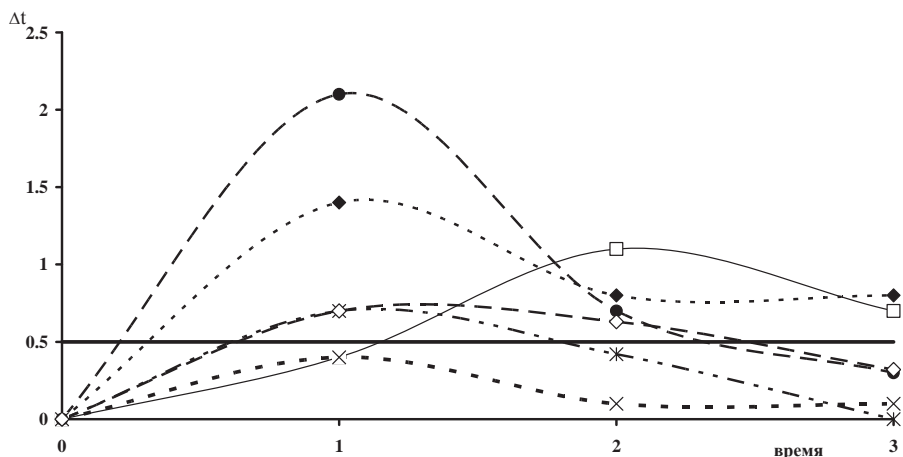


Рис. 1. Пирогенная активность ЛПС *B. aquatica* штаммов: ЛНМИЗ 96U101 (□-), ЛНМИЗ 97U124 (◊-), ЛНМИЗ 97U126 (×-), DRL 20186 (◊-), DRL 23270 (◊-), DRL 24833 (◊-)

Как свидетельствуют результаты, ЛПС *B. aquatica* DRL 23270, 20186 и ЛНМИЗ 97U124 проявили значительно более высокую пирогенную активность, чем пирогенал – фармацевтический препарат, действующим компонентом которого является ЛПС *Shigella typhi*.

Известно, что некоторые нетоксичные липиды А могут блокировать рецепторы ЛПС на клетках-мишенях макроорганизма, предотвращая развитие токсических реакций и, таким образом, проявляя свойства антагонистов эндотоксинов. Незначительная токсичность ЛПС ряда штаммов *B. aquatica* дает основание надеяться, что они могут быть перспективными для дальнейших исследований в анти-ЛПС стратегии борьбы с септическим шоком.

О.С. Броварська¹, Л.Д. Варбанець¹, С.И. Похил²

¹Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К.Заболотного НАН України,
вул. академіка Заболотного, 154, Київ МСП, Д03680, Україна

²Інститут мікробіології і імунології ім. І.І. Мечнікова АМН України,
61057 Харків, вул. Пушкінська 14/16, Україна

БИОЛОГИЧНА АКТИВНІСТЬ ЛІПОПОЛІСАХАРИДІВ *BUDVICIA AQUATICA*

Резюме

Вперше вивчено жирнокислотний склад ліпідів А ліпополісахаридів 6 штамів *Budvicia aquatica* – представників нового виду Enterobacteriaceae. Встановлена присутність жирних кислот з довжиною вуглецевого ланцюга від C₁₂ до C₁₈. Усі досліджувані штами *B. aquatica* містили 3-окситетрадеканову кислоту (23,1-43,8 %, в залежності від штаму), яка була домінуючою і характерною для родини Enterobacteriaceae. Досліджувані штами проявляли токсичність і пірогенність.

Ключові слова: *Budvicia aquatica*, ліпополісахарид, ліпід А, жирнокислотний склад, токсичність, пірогенність

O.S. Brovarskaya¹, L.D. Varbanets¹, S.I. Pokhil²

¹Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv

²Mechnikov Institute of Microbiology and Immunology, Academy of Medical Sciences of Ukraine, Kharkiv

BIOLOGICAL ACTIVITY OF *BUDVICIA AQUATICA* LIPOPOLYSACCHARIDES

Summary

The fatty acid composition of lipopolysaccharides (LPS) lipids A of *Budvicia aquatica* strains (n = 6) – representatives of Enterobacteriaceae new species are studied for the first time. It was established that fatty acids with the length of carbon chains from C₁₂ to C₁₈ are presented. All of *B. aquatica* strains tested have been found to contain 3-hydroxytetradecanoic acid (23.1-43.8 %, depending on the strain), which was predominant and characteristic of representatives of Enterobacteriaceae family. LPS of the tested strains displayed toxicity and pyrogenicity.

The paper is presented in Russian.

Key words: *Budvicia aquatica*, lipopolysaccharide, lipid A, fatty acid composition, toxicity and pyrogenicity.

The author's address: Brovarskaya O.S., Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, National Academy of Sciences of Ukraine; 154 Acad. Zabolotny St., Kyiv, MSP, D03680, Ukraine.

1. Варбанець Л.Д., Броварська О.С., Похил С.І. Характеристика ліпополісахаридів *Budvicia aquatica* / Мікробіол. журн. – 2011. – 73, №3. С. 21–25.
2. Варбанець Л.Д., Здоровенко Э.А., Гаркавая Е.Г., Броварская О.С. Липополисахариды *Escherichia coli* M-17//Микробиология – 2012 – 81, №3. – С. 353–360.
3. Варбанець Л.Д., Здоровенко Г.М., Книрель Ю.А. Методи дослідження ендотоксинів. – Київ: Наук. думка, 2006. – 237 с.
4. Остапчук А.М. Ліпополісахариди *Rahnella aquatilis*: структурно-функціональні дослідження: Автореф. дис. ... канд. біол. наук: 03.00.07 / ИМБ – К., 2005 Автореф. дис. ... канд. біол. наук: 03.00.07 / ИМБ – К., 2002 – 21 с.
5. Шубчинський В.В. Ліпополісахариди *Pragia fontium*: хімічна характеристика та біологічна активність: Автореф. дис. ... канд. біол. наук: 03.00.07 / ИМБ – К., 2008 – 24 с.
6. Takahashi K., Morikawa A., Kato Y. et al. Flavonoids protect mice from two types of lethal shock induced by endotoxin // FEMS Immun. Microbiol. – 2001. – 31. – P. 29–33.

Отримано 26.05.2011