

**НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ МІКРОБІОЛОГІЇ І ВІРУСОЛОГІЇ ІМ. Д.К. ЗАБОЛІТНОГО**

ВІНАРСЬКА НАТАЛІЯ ВІКТОРІВНА

УДК 579.841.11.22

**ЗАЛЕЖНІСТЬ БІОЛОГІЧНОЇ АКТИВНОСТІ
ЛІПОПІЛІСАХАРИДІВ *RALSTONIA SOLANACEARUM* (Smith, 1896) ВІД
ЇХ СКЛАДУ ТА СТРУКТУРНИХ ОСОБЛИВОСТЕЙ**

03.00.07 – мікробіологія

Автореферат
дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук

КИЇВ - 2002

Дисертацією є рукопис.

Робота виконана у відділі біохімії мікроорганізмів Інституту мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України.

Науковий керівник: доктор біологічних наук, старший науковий співробітник
Варбанець Людмила Дмитрівна, Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України, завідувач відділу біохімії мікроорганізмів

Офіційні опоненти: доктор біологічних наук, професор **Зайченко Олександр Максимович**, Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України, завідувач лабораторії вторинних метаболітів мікроміцетів

доктор медичних наук, **Шапіро Анатолій Вініамінович**, Київський НДІ епідеміології та інфекційних хвороб ім. Л.В. Громашевського МОЗ України, провідний науковий співробітник

Провідна установа: Одеський національний університет ім. І.І. Мечникова

Захист відбудеться “19” червня 2002 р. о 10⁰⁰ годині на засіданні Спеціалізованої вченої ради Д 26.233.01 по захисту докторських дисертацій при Інституті мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України за адресою: 03143, м. Київ, вул. Заболотного, 154.

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці Інституту мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України за адресою: 03143, м. Київ, вул. Заболотного, 154.

Автореферат дисертації розіслано "17" травня 2002 р.

Вчений секретар
Спеціалізованої вченої ради,
кандидат біологічних наук,
старший науковий співробітник
Пуріш Л.М.

Актуальність проблеми. *Ralstonia solanacearum* (*Pseudomonas solanacearum*, Smith 1896) – фітопатогенний мікроорганізм, що викликає бактеріальний вілт широкого кола рослин (більше 55 родин), серед яких ряд економічно важливих сільськогосподарських культур: пасльонові, бобові, складноцвіті, тощо. Цей мікроорганізм є гетерогенним за біологічними властивостями, в систематиці якого багато невіршених проблем. Довгий час представників *R. solanacearum* відносили до роду *Pseudomonas*. Однак з 1992 р. японські дослідники (Yabuuchi et al.) двічі перекласифікували його: спочатку перенесли до роду *Burkholderia*, а пізніше (в 1995 р.) – до нового роду *Ralstonia*. Але, разом з тим, було зазначено що гетерогенність штамів *R. solanacearum* потребує подальших досліджень для з'ясування таксономічного положення представників цього виду.

Визнаним хемотаксономічним критерієм, що використовуються в систематиці грамнегативних бактерій, є склад і будова ліпополісахаридів (ЛПС) – структурних компонентів зовнішньої мембрани клітинної оболонки грамнегативних бактерій, що включають три високоспецифічні складові ділянки з різною біологічною активністю: О-специфічний полісахаридний ланцюг (О-ПС), олігосахарид кору (ОГ-кор) та ліпід А. Великий інтерес, який продовжує привертати увагу дослідників, це надзвичайно широкий спектр біологічної дії ЛПС, що обумовлюється їх структурними особливостями. Відомо, що тонкі варіації в структурі О-ланцюгів ЛПС визначають серологічну специфічність грамнегативних бактерій та використовуються як молекулярна основа серологічних класифікаційних схем. На відміну від багатьох грамнегативних бактерій (*Klebsiella*, *Escherichia*, *Salmonella*, *Pseudomonas*, тощо) для *R. solanacearum* досі відсутня внутрішньовидова класифікаційна схема, що заснована на О-антигенності їх ЛПС. Ліпід А є ендотоксичним центром молекули ЛПС, який відповідає за більшість фізіологічних і патофізіологічних реакцій: летальну токсичність, пірогенність, ендотоксинову толерантність, лейкопенію, ад'ювантність, мітогенну стимуляцію, активацію комплементу, індукцію неспецифічної резистентності до інфекцій, захист організму від радіації, тощо. Крім того, особливості складу жирних кислот ліпиду А, зокрема 3-оксикислот, можуть бути використані як додатковий хемотаксономічний критерій в систематиці мікроорганізмів.

Висока імуномодулююча активність ЛПС дозволяє використовувати їх при створенні нових лікарських засобів. Однак, складність впровадження до терапевтичної практики ЛПС в значній мірі обумовлена їх високою токсичністю та пірогенністю, а також недостатністю або непостійністю їх стимулюючого ефекту. Цей факт спонукає дослідників, поряд з постійним пошуком нових, менш токсичних глікополімерів, розробляти підходи до отримання модифікованих ЛПС, що втрачали би токсичну дію, але зберігали імуномодулюючі властивості.

З огляду на це, отримані дані про зв'язок між біологічною (антигенною, пірогенною і токсичною) активністю ЛПС *R. solanacearum* та особливостями їх складу та структури

можуть бути використані для уточнення таксономічного статусу представників цього виду, а також при подальших розробках його внутрішньовидової класифікаційної схеми та серодіагностиці. Виявлення ЛПС, які не володіють токсичною та пірогенною дією, може бути використано при створенні нових терапевтичних препаратів з імуномодуючими властивостями.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційна робота включає дослідження, виконані згідно науково-дослідних робіт інституту за темами: “Вивчення залежності біологічної активності глікополімерів мікробної клітини від їх фізико-хімічних та структурних особливостей. Розробка нових стратегій використання глікополімерів” (1998 – 2002 рр., № держ. реєстр. 0198V008078, шифр теми за планом інституту 07.20); “Дослідження антигенних та ендотоксичних властивостей бактеріальних глікополімерів” (2002 – 2007 рр., програма “Молекулярні основи функціонування геному”, № теми за планом інституту 07.71); “Вплив фізичних та хімічних факторів на структурні особливості і біологічну активність ліпополісахаридів (ендотоксинів)” (2001 – 2002 рр., № проекту Держ. фонду фонд. Досліджень 05.07/00012).

Мета і задачі дослідження. Виділити, хімічно охарактеризувати ЛПС *Ralstonia solanacearum*, встановити залежність між їх біологічною (антигенною, пірогенною, токсичною) активністю та особливостями складу й структури.

Відповідно до поставленої мети було сформульовано такі задачі:

1. Одержати ЛПС із 8 штамів *R. solanacearum*, які характеризуються різним типом структури О-ПС.
2. Вивчити хімічний склад ЛПС.
3. Вивчити антигенну активність ЛПС *R. solanacearum* в гомологічних та гетерологічних системах.
4. Дослідити пірогенну та токсичну дію ЛПС.
5. Встановити внесок окремих структурних компонентів молекули ЛПС на прояв біологічних властивостей:
 - а) отримати модифіковані ЛПС при застосуванні фізичних (УФ-опромінення) та хімічних (О-деацильовання, N-, O-деацильовання і дефосфорильовання) методів;
 - б) провести порівняльне вивчення серологічної, пірогенної та токсичної активності нативного та модифікованих ЛПС.

Об'єктом дослідження були ліпополісахариди представників фітопатогенного виду *R. solanacearum* – гетерогенного за біологічними властивостями мікроорганізму, в систематиці якого на сьогодні багато невирішених проблем.

Предметом дослідження були склад та деякі аспекти біологічної (антигенної, пірогенної та токсичної) активності ЛПС різних штамів *R. solanacearum*, які характеризувались тонкими варіаціями в структурі їх О-ПС.

Матеріали та методи дослідження. Для виконання поставлених завдань використовували мікробіологічні, біохімічні та імунологічні методи, а також методи біологічного контролю визначення пірогенності та токсичності ЛПС.

Наукова новизна отриманих результатів. Вперше було показано, що за складом жирних кислот ліпідів А штами *R. solanacearum* були розподілені на дві групи. Для першої групи характерною була наявність жирних оксикислот з ланцюгом від 12 до 18 атомів вуглецю (ICMP 5712, 7945, 7955 і 8110). Друга група штамів містила жирні оксикислоти з меншим числом вуглецевих атомів від C10 до C14 (ICMP 767, 7944, 8089 і 4157).

Вперше на основі О-антигенності ЛПС, досліджувані штами *R. solanacearum* були розділені на п'ять серогруп.

Вперше для виду *R. solanacearum* встановлено, що ЛПС досліджуваних штамів мають типовий для ЛПС S-форми бімодальний електрофоретичний розподіл і включають два основних типи молекул (високомолекулярний S-ЛПС і низькомолекулярний R-ЛПС). ЛПС представників однієї серогрупи характеризуються подібним електрофоретичним розподілом і відрізняються за цим показником від ЛПС представників інших серогруп.

Вперше для ЛПС представників *R. solanacearum* як в гомологічних, так і в гетерологічних системах виявлено серологічно активні зони, які містяться в S-, SR- та R-ЛПС.

Вперше було показано, що ЛПС досліджуваних штамів характеризуються різним ступенем прояву пірогенності та токсичності.

Вперше встановлено, що модифікація ЛПС *R. solanacearum* внаслідок O-, N-, O-деацильовання та дефосфорильовання призводить до втрати пірогенної та токсичної активності.

Практичне значення одержаних результатів. Результати роботи мають особливу цінність для таксономії бактерій виду *R. solanacearum*, а також можуть бути використані при подальших розробках внутришньовидової класифікаційної схеми виду *R. solanacearum* та серодіагностиці. Виявлення ЛПС, які не проявляють токсичної та пірогенної дії, в майбутньому може бути використано при створенні нових терапевтичних препаратів з імуномодуючими властивостями.

Особистий внесок здобувача. Основні експериментальні дані були одержані здобувачем особисто: напрацьована бактеріальна маса 8 досліджуваних штамів *R. solanacearum*, з яких виділені ЛПС, вивчений хімічний склад ЛПС: вміст вуглеводів, нуклеїнових кислот, білку. Проведений аналіз моносахаридного, амінокислотного та жирнокислотного складу виділених препаратів ЛПС.

Отримані поліклональні O-антисироватки до 8 досліджуваних штамів *R. solanacearum*. При вивченні антигенної активності проведені серологічні дослідження ЛПС штамів *R. solanacearum* методами кільцепреципітації, аглютинації, імуоелектрофорезу, подвійної імунодифузії в агарі за Оухтерлоні, ракетного імуоелектрофорезу, ELISA, ELISA-інгібування, ДСН-ПААГ електрофорезу та імуноблотингу. Проведено вивчення пірогенної та токсичної активності ЛПС.

Одержання модифікованих ліпідів А досліджуваних ЛПС здійснено спільно з к.б.н. Васильєвим В.М. (Інститут мікробіології та вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України, Київ).

Вплив УФ-опромінення на серологічну активність ЛПС здійснено спільно з к.ф.-м.н. Кислюком В.В. та д.ф.-м.н. Лозовським В.З. (Інститут фізики напівпровідників НАН України, Київ).

Аналіз результатів, їх узагальнення, інтерпретацію та формулювання основних положень і висновків проведено спільно з науковим керівником. Друковані роботи підготовлено при безпосередній участі автора спільно з науковим керівником.

Автор висловлює щире подяку інж. Житкевич Н.В. за допомогу у підтримці мікробіологічно чистої культури досліджуваних штамів, а також к.б.н. Нестеровій Н.В., к.б.н. Діденко Л.Ф., к.б.н. Яковлевій Л.М. та інж. Броварській О.С. (Інститут мікробіології та вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України, Київ) за надання консультацій при проведенні імунохімічного аналізу досліджуваних препаратів ЛПС.

Апробація результатів дисертації. Основні результати досліджень та положення дисертації доповідались та обговорювались на засіданні II (IX) з'їзду

Мікробіологічного товариства України (Чернігів, 2000); 6th Conference of the International Endotoxin Society (Paris, 2000); на конкурсі експериментальних робіт

молодих дослідників ІМВ НАНУ (Київ, 2000); на Міжнародній конференції науково-практичної школи для молодих учених і спеціалістів “Природні екосистеми Карпат в умовах посиленого антропогенного впливу” (Ужгород, 2001); the European Materials Research Society (E-MRS 2001) Spring Meeting (Strasbourg, 2001); XVI International Symposium on Glycoconjugates “GLYCO XVI” (Hague, 2001); 11th European Carbohydrate Symposium “Eurocarb-11” (Lisboa, 2001); на конкурсі експериментальних робіт молодих дослідників ІМВ НАНУ, присвяченому 135-й річниці з дня народження Д.К. Заболотного (Київ, 2001); в матеріалах спільного засідання відділень молекулярної біології, біохімії, експериментальної та клінічної фізіології і загальної біології НАН України та Вченої ради біологічного факультету КНУ ім. Тараса Шевченка (Київ, 2001).

Публікації. За матеріалами дисертації опубліковано 8 наукових робіт в провідних вітчизняних та закордонних виданнях: 4 статті у наукових журналах, з яких 3 – у фахових виданнях, 4 – матеріали конференцій.

Структура та обсяг роботи. Дисертаційна робота викладена на 154 сторінках машинописного тексту і складається з розділів “Вступ”, “Огляд літератури”, “Матеріали та методи досліджень”, “Результати досліджень”, “Обговорення”, “Висновки”, “Список використаних джерел”, який містить 219 посилань (з яких 194 іноземних авторів). Робота містить 17 таблиць та 20 рисунків.

РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

Огляд літератури представлений двома підрозділами, які містять сучасні уявлення щодо гетерогенності та таксономічного положення представників фітопатогенного виду *R. solanacearum*, який уражує понад 600 видів рослин і на сьогодні став актуальною проблемою епіфітотії бактеріального вілту, а також викладена інформація останніх років щодо ліпополісахаридів грамнегативних бактерій, їх структури, функції та біологічної активності.

РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Об'єктами досліджень були 8 штамів *R. solanacearum*. Всі культури були люб'язно надані куратором ІСМР доктором Дж. Янгом (Нова Зеландія), за що ми висловлюємо йому щире подяку. Штами були виділені в різних географічних зонах світу з різних рослин і за своїми властивостями віднесені до різних біоварів (табл.1).

Культивування бактерій проводили на рідкому синтетичному середовищі, що містило глюкозу та хлористий амоній як джерела вуглецю та азоту, відповідно [Vidaver, 1967].

Таблиця 1

Характеристика досліджених штамів *R. solanacearum*

Штам ІСМР	Географічна зона	Біовар	Рослина-хазяїн
5712 – типовий (NCPPV 325, ATCC 11696)		США 1	томати
767	Тринідад	1	банани
4157	Нова Зеландія	НВ*	картопля
7944	Перу	1	подорожник
7945	Перу	4	картопля
7955	Кенія	3	баклажани
8089	Філіппіни	2	солодкий перець
8110	Шрі Ланка	4	картопля

НВ* - не визначений

Виділення та очищення ЛПС проводили за водно-фенольним методом Вестфалю та Янна. Деградацію ЛПС здійснювали м'яким кислотним гідролізом в 1% оцтовій кислоті. Ультрацентрифугуванням (25000g, 40 хв.) відділяли гідрофільні та гідрофобні частини деградованого ЛПС. Окремі вуглеводні компоненти молекули ЛПС одержували за допомогою гель-хроматографії на сефадексі G-50 з використанням 0,025M піридин-ацетатного буфера, рН 4,5. Визначення кількості вуглеводів здійснювали за Dubois (1956), нуклеїнових кислот – за Спіріним (1958), білку – за Lowry (1951). Гептози визначали реакцією з цистеїном та сірчаною кислотою [Davies, 1957], 2-кето-3-дезоксид-маннооктонову кислоту (КДО) – реакцією з тіобарбітуровою кислотою [Droge, 1970]. Нейтральні моносахариди у вигляді ацетатів поліолів ідентифікували на газовому хроматографі "Chrom-5" (Чехія). Визначення вмісту амінокислот та гексозамінів проводили на аналізаторі амінокислот "Hitachi" (Японія). Жирнокислотний склад ліпідів А у вигляді метилових ефірів жирних кислот аналізували на газовому хроматографі Hewlett Packard 5890 серії II (США) в комбінації з мас-спектрометром 5970В (Hewlett Packard, США) та подальшої обробки результатів з використанням персонального комп'ютера.

Імунохімічні властивості ЛПС вивчали, застосовуючи методи кільцепреципітації, аглютинації, імуноелектрофорезу, подвійної імунодифузії в агарі за Оухтерлоні, ракетного імуноелектрофорезу, ELISA та ELISA-інгібування, де ЛПС, виділені з клітин досліджуваних штамів, були використані як антигени, а поліклональні О-антисироватки кролів, отримані до грітих культур досліджуваних штамів *R. solanacearum*, як антитіла.

Електрофорез здійснювали в системі ДСН-ПААГ за Laemmli (1970) із застосуванням 5% концентруючого та 12% розділяючого акріламідних гелів при постійній силі струму 30 mA. Гелі фарбували за допомогою азотнокислого срібла [Tsai, 1982].

Імуноелектроблотінг проводили за методикою Pyle (1985) з переносом ЛПС на нітроцелюлозну мембрану (Schleicher-Schuell, розмір пор 0,45 мкм) при режимі 150 mA протягом 4 год. Субстратом та хромогеном були H_2O_2 та 3,3'-діамінобензидин.

Пірогенність вивчали на кролях шляхом внутрішньовенного введення мінімальної пірогенної дози, встановленої в серії розведень ЛПС (0,01-0,005 мкг/мл), з подальшою термометрією тварин протягом 3 год. Кожну серію розчинів ЛПС перевіряли на кролях, близьких за вагою (0,5 кг). ЛПС вважали непірогенним, якщо сума підвищення температур у 3-х кролів була меншою або дорівнювала 1,4°C; якщо ця сума перевищувала 2,2°C – ЛПС вважали пірогенним.

Токсичну дію ЛПС (ЛД₅₀) досліджували на мишах, сенсibilізованих галактозамінгідрохлоридом, при внутрішньовенному введенні серії розведень ЛПС (50-300 мкг/мл). Кожну серію розведень ЛПС випробовували на 10 мишах; контрольній групі мишей (10 мишей) вводили разом з галактозамінгідрохлоридом стерильний розчин 0,9% NaCl.

Модифіковані ЛПС отримували шляхом О-деацильовання (гідроліз в 0,2 N NaOH в 99% етанолі, 18 год., 50°C), N-, O-деацильовання (гідроліз в безводному гідразині, 40 год., 100°C) та дефосфорилування (гідроліз в 40% розчині HF, 24 год., кімнатна температура). Дослідження прояву біологічної (токсичної та пірогенної) активності модифікованих ЛПС визначали раніше зазначеними методами.

УФ-опромінення ЛПС проводили при використанні імпульсного азотного лазера (ЛГИ-101, ССРСР). Спектральний оптичний відгук реєстрували в межах 350-600 nm при використанні монохроматора з лічильником фотонів, який був обладнаний схемою збігу. Опромінення проводили в режимі кроку сканування 2 nm та часу підрахунку 5 сек при заданому часі рахунку сканування 7-10 хв. Серологічну активність

опромінених ЛПС досліджували подвійною імунодифузією в агарі за Оухтерлоні. Результати дослідів статистично обробляли, використовуючи коефіцієнт Ст'юдента.

РОЗДІЛ 3. ВИДІЛЕННЯ ЛПС *R. solanacearum*, ВИЗНАЧЕННЯ ЇХ КОМПОНЕНТНОГО СКЛАДУ

ЛПС були екстраговані з висушених ацетоном та ефіром клітин 8 штамів *R. solanacearum*. Було встановлено, що штами даного виду відрізняються між собою за відносним вмістом ЛПС: незважаючи на те, що екстракція ЛПС здійснювалась за однакових умов, кінцевий вихід ЛПС по відношенню до сухої бактеріальної маси коливався у різних штамів: 2,7-7,8%. Оскільки високий вміст нуклеїнових кислот є характерним для представників виду *R. solanacearum*, проводили додаткову очистку ЛПС від них шляхом триразового ультрацентрифугування при 144000g, 4 год., або осадженням насиченим розчином трихлороцтової кислоти. Очищені ЛПС в залежності від штаму містили: 16,5-47,25% вуглеводів, 1,44-3,6% нуклеїнових кислот, 0,25-3,25% білку.

Аналіз моносахаридного складу показав, що домінуючим моносахаридом ЛПС всіх штамів, крім шт. 4157, є рамноза (26,53-92,8%). Для ЛПС шт. 4157 характерним був високий вміст арабінози (84,6%) порівняно з рамнозою (13,3%). Крім того, ЛПС деяких штамів (7945, 5712 та 767) містили ксилозу, яка також вважається характерною для ЛПС представників виду *R. solanacearum* (61,36%, 8,72% та 6,81%, відповідно). ЛПС деяких штамів містили менш характерні для представників даного виду вуглеводні залишки: фукозу, арабінозу, рибозу, манозу. З гексозамінів у складі отриманих ЛПС були присутні глюкозамін (1,4-16,8%) та галактозамін (0,66-8,48%). В ЛПС виявлені також гептоза (0,25-2,08%) та КДО (0,03-0,4%).

ЛПС характеризувались незначними кількостями амінокислот. За якісним складом картина їх розподілу була досить різноманітна: представлені майже всі амінокислоти (за винятком лейцину та тирозину), однак найбільш характерними виявились аланін (0,2-6,0%) та гістидин (0,11-0,8%).

Внаслідок деградації ЛПС шт. 5712 одержані ліпід А та вуглеводні компоненти. Профіль елюції вуглеводної частини деградованого ЛПС [О-ПС (фракція I) і ОГ-кор (фракції II і III)] свідчить, що в дослідженому ЛПС переважною є S-форма ЛПС. Аналіз жирних кислот показав, що за їх вмістом ЛПС досліджуваних штамів суттєво відрізнялись (табл. 2).

Відомо, що своєрідність жирнокислотного складу ліпиду А – найбільш консервативної частини молекули ЛПС – може бути використано як додатковий критерій при диференціації окремих видів мікроорганізмів з невизначеним систематичним положенням, до яких належить і *R. solanacearum*. Характерними для типового штаму *R. solanacearum* були 3-окситетрадеканова (33,53%), тетрадеканова (19,22%), 2-оксигексадеканова (21,55%), 2-оксиоктадеканова (3,12%) та октадеценева (2,66%) жирні кислоти. Більш схожими до типового виявились шт. 7945, 7955 та 8110, в ЛПС яких також були присутні зазначені жирні кислоти. Однак, разом з тим, були виявлені деякі відмінності щодо кількісного та якісного вмісту жирних кислот цих штамів. Так, ЛПС шт. 7945, 7955 і 8110 відрізнялись за вмістом C16:0 (12,56%, 6,09% і 7,29%, відповідно); для ЛПС шт. 7945 була характерною наявність ізомерної 2-ОН-C16:0 (2,67%); ЛПС шт. 7945, 7955 і 8110 містили 3-ОН-C15:0 (1,38, 1,35 і 2,66%, відповідно); в ЛПС шт. 7945 і 8110 була наявною цис-9-C18:0. Крім того, тільки для ЛПС типового штаму була виявлена присутність 2-ОН-C18:1 (8,3%).

Цікаво зазначити той факт, що присутність 3-ОН-C14:0 є характерною для представників *Burkholderia cepacia* [Солдаткина, 1989] – типового виду роду

Burkholderia, до якого нещодавно відносили і *R. solanacearum*. Ознакою іншого фітопатогенного виду *Erwinia carotovora*, а також більшості представників роду *Enterobacteriaceae* [Жеребило, Вишталюк, 1991; Мороз, 2002; Branderburg et al., 1993] є переважність вмісту в ЛПС 3-ОН-С14:0, С16:0 та С14:0 жирних кислот, які містяться в складі типового штаму *R. solanacearum* та близьких до нього штамів.

Таблиця 2

Жирні кислоти	Жирнокислотний склад ліпідів А ЛПС <i>R. solanacearum</i> (в % до загальної суми площин піків)								
	Штами ІСМР								
	5712	7945	7955	8110	767	7944	8089	4157	
3-ОН-С10:0	-	-	-	-	-	-	-	18,23	3,45
С12:0	0,81	0,07	0,53	0,93	1,07	19,76	16,21	-	-
2-ОН-С11:0	-	-	-	-	-	-	-	-	6,61
3-ОН-С11:0	-	-	-	-	-	-	3,0	1,14	1,15
2-ОН-С12:0	-	-	-	-	-	-	-	23,6	4,34
3-ОН-С12:0	0,74	0,44	0,28	0,36	0,85	25,64	18,12	24,47	-
С14:0	19,22	16,63	20,64	16,21	4,19	3,17	1,85	3,38	-
2-ОН-С13:0	-	-	-	-	-	-	-	-	14,1
3-ОН-С13:0	0,16	-	1,71	0,15	-	-	-	-	6,15
i-С15:0	0,11	-	-	-	-	18,1	1,47	0,62	6,65
ai-С15:0	-	-	-	-	-	27,04	-	1,22	9,52
2-ОН-С14:0	-	-	2,17	1,7	-	-	-	-	-
3-ОН-С14:0	33,53	24,41	27,61	23,68	1,04	16,9	0,39	1,66	-
С16:1	-	-	1,16	2,71	-	-	-	-	-
С16:0	8,72	12,56	6,09	7,29	18,0	22,74	13,71	3,17	-
3-ОН-С15:0	-	1,38	1,35	2,66	-	-	-	-	-
ai-С17:0	-	-	-	-	-	7,92	1,45	0,48	1,88
isomeric-2-ОНС16:0	-	-	2,67	-	-	-	-	-	-
2-ОН-С16:0	21,55	10,43	5,27	10,51	-	-	-	-	-
3-ОН-С16:0	1,09	0,82	0,63	1,43	3,44	1,63	-	-	-
cis-9-С18:0	-	10,65	-	6,86	-	-	-	-	-
trans-9-С18:1	-	-	5,07	-	-	-	-	-	-
С18:1	2,66	2,37	8,7	6,61	17,45	4,24	4,43	13,47	-
2-ОН-С18:1	8,3	-	-	-	-	-	-	-	-
2-ОН-С18:0	3,12	17,56	17,32	14,32	-	-	-	-	-
3-ОН-С18:0	-	-	1,48	3,92	-	-	-	-	-

Склад жирних кислот ЛПС штамів 767, 7944, 8089 і 4157 принципово відрізнявся від типового штаму та подібних до нього шт. 7945, 7955 і 8110. Для них виявилась характерною присутність оксикислот з більш короткою довжиною вуглецевого ланцюга: 2-ОН-С11:0 (шт. 4157-6,61%), 3-ОН-С10:0 (шт. 8089 і 4157 – 18,23 і 3,45%, відповідно), 3-ОН-С11:0 (7944, 8089 і 4157 – 3,0%, 1,14% і 1,15%, відповідно), 2-ОН-С12:0 (8089 і 4157 – 23,6 і 4,34%, відповідно), 3-ОН-С12:0 (7944, 8089 і 4157 – 25,64%, 18,12% і 24,47%, відповідно), 2-ОН-С13:0 і 3-ОН-С13:0 (шт. 4157 – 14,1% і

6,15%, відповідно), 3-ОН-С14:0 і С12:0 (7944, 8089 4157). Наявність 3-ОН-С10:0, 3-ОН-С12:0 і 2-ОН-С12:0 наближує ці штами до фітопатогенних видів *P. syringae* та *P. fluorescens* [Веремейченко, Здоровенко, 2000].

Раніше Варбанець та співавт. (1993) при аналізі 25 штамів *R. solanacearum* встановили 8 типів структур О-ПС (табл. 3).

Структурні відміни були наступні: 1) повторювальний ланцюг О-ПС деяких штамів містив β -(1>2)-, β -(1>3)- β бо β -(1>3)-зв'язаний N-ацетилглюкозамін; 2) в О-ПС деяких штамів була присутня тільки тетрасахаридна лінійна структура, в інших – пентасхаридна розгалужена, де L-ксилоза або L-рамноза виступали як термінальні замісники; 3) в О-ПС деяких штамів був присутній тільки один тип структури, в той час як інші характеризувались гетерогенною організацією і були представлені більш, ніж одним, типом структури О-ПС; 4) крім того в дослідженнях були присутні два штами 8089 та 4157, які принципово відрізнялись від інших штамів, їх О-ПС були представлені трисахаридними ланцюгами з лінійною та розгалуженою структурою, відповідно.

Таблиця 3

Розподілення типів структур О-ПС ланцюга, що повторюється, в ЛПС досліджуваних штамів <i>R. solanacearum</i>						
ICMP штам	О-ПС структура	Тип структур, співвідношення структур, %				
8110	$\text{B} \text{C} \text{D} \text{I}$ $\text{B} \text{C} \text{D} \text{I}$ $\text{B} \text{C} \text{D} \text{I}$ $\text{B} \text{C} \text{D} \text{I}$	C	D	I	100 %	A
767	$\text{B} \text{C} \text{D}$ $\text{B} \text{C} \text{D}$ $\text{B} \text{C} \text{D}$	C	D	I	100 %	2
5712	$\text{B} \text{C} \text{D}$ $\text{B} \text{C} \text{D}$ $\text{B} \text{C} \text{D}$	C	D	I	100 %	2
-4	$\text{B} \text{C} \text{D}$ $\text{B} \text{C} \text{D}$ $\text{B} \text{C} \text{D}$	C	D	I	100 %	2
S1	$\text{B} \text{C} \text{D}$ $\text{B} \text{C} \text{D}$ $\text{B} \text{C} \text{D}$	C	D	I	100 %	2
b-L-Xyl	$\text{B} \text{C} \text{D}$ $\text{B} \text{C} \text{D}$ $\text{B} \text{C} \text{D}$	C	D	I	100 %	2
7955	$\text{B} \text{C} \text{D}$ $\text{B} \text{C} \text{D}$ $\text{B} \text{C} \text{D}$	C	D	I	100 %	4
7945	$\text{B} \text{C} \text{D}$ $\text{B} \text{C} \text{D}$ $\text{B} \text{C} \text{D}$	C	D	I	100 %	4
-4	$\text{B} \text{C} \text{D}$ $\text{B} \text{C} \text{D}$ $\text{B} \text{C} \text{D}$	C	D	I	100 %	4
S1	$\text{B} \text{C} \text{D}$ $\text{B} \text{C} \text{D}$ $\text{B} \text{C} \text{D}$	C	D	I	100 %	4
b-L-Xyl	$\text{B} \text{C} \text{D}$ $\text{B} \text{C} \text{D}$ $\text{B} \text{C} \text{D}$	C	D	I	100 %	4
7944	$\text{B} \text{C} \text{D}$ $\text{B} \text{C} \text{D}$ $\text{B} \text{C} \text{D}$	C	D	I	100 %	4
-3 S1	$\text{B} \text{C} \text{D}$ $\text{B} \text{C} \text{D}$ $\text{B} \text{C} \text{D}$	C	D	I	100 %	4
8089	$\text{B} \text{C} \text{D}$ $\text{B} \text{C} \text{D}$ $\text{B} \text{C} \text{D}$	C	D	I	100 %	7
4157	$\text{B} \text{C} \text{D}$ $\text{B} \text{C} \text{D}$ $\text{B} \text{C} \text{D}$	C	D	I	100 %	7
-4	$\text{B} \text{C} \text{D}$ $\text{B} \text{C} \text{D}$ $\text{B} \text{C} \text{D}$	C	D	I	100 %	7
S1	$\text{B} \text{C} \text{D}$ $\text{B} \text{C} \text{D}$ $\text{B} \text{C} \text{D}$	C	D	I	100 %	7
b-D-Araf	$\text{B} \text{C} \text{D}$ $\text{B} \text{C} \text{D}$ $\text{B} \text{C} \text{D}$	C	D	I	100 %	8

РОЗДІЛ 4. СЕРОЛОГІЧНА СПЕЦИФІЧНІСТЬ ЛПС

Відомо, що тонкі варіації в структурі О-ПС ланцюгів визначають серологічну специфічність грамнегативних бактерій та використовуються як молекулярна основа серологічних класифікаційних схем. Для *R. solanacearum* досі не існує класифікаційної схеми, заснованої на серологічній специфічності їх ЛПС. З огляду на це було проведено дослідження з метою встановлення можливої кореляції між серологічною активністю ЛПС та структурою О-ПС, для чого були обрані штами *R. solanacearum*, які характеризувались різними типами структури О-ПС (табл. 3).

Визначення імунохімічних властивостей ЛПС проводили за допомогою

поліклональних О-антисироваток кролів, отриманих до грітих бактеріальних культур досліджуваних штамів, які використовувались в якості антитіл. В якості антигенів виступали ЛПС, одержані з клітин даних штамів.

Кожний з існуючих в даний час імунохімічних методів поряд з перевагами характеризується також рядом недоліків. З врахуванням цього, вивчення серологічних властивостей та специфічності ЛПС *R. solanacearum* здійснювали за допомогою ряду методів.

В гомологічних системах при проведенні реакцій аглютинації, кільцепреципітації, подвійної імунодифузії в агарі за Оухтерлоні, а також імуноелектрофорезі було показано, що ЛПС всіх досліджуваних штамів *R. solanacearum* виявляли серологічну активність щодо гомологічних О-антисироваток в досить високих титрах (найбільше розведення антигену або сироватки, при яких спостерігались чітко позитивні реакції, становили 1:160000 та 1:3200 в реакціях кільцепреципітації та аглютинації, відповідно) і характеризувались складним антигенним складом (від 1 до 3 антигенних факторів, виражених в преципітаційних лініях в реакціях подвійної імунодифузії та імуноелектрофорезу).

При таксономічних дослідженнях, як один з підходів в класифікації мікроорганізмів, можуть бути використані серологічні перехресні реакції.

На підставі серологічної спорідненості, виявленої в гетерологічних системах ракетного імуноелектрофорезу та подвійної імунодифузії в агарі за Оухтерлоні досліджувані штами були розділені на п'ять серогруп.

Дані ELISA та ELISA-інгібування, які були отримані в гомологічних та гетерологічних системах, цілком підтверджують результати щодо такого розподілу попередніх досліджень.

До першої серогрупи були віднесені 4 штами (5712, 7945, 7955 та 8110), ЛПС яких виявляли серологічну спорідненість не тільки до гомологічної О-антисироватки, а також і до гетерологічних сироваток цих штамів при рівноважному зворотньому реагуванні.

До другої та третьої серогруп були віднесені два штами: 767 та 7944, відповідно, О-антисироватки яких, крім гомологічного ЛПС, впізнавали також ЛПС типового штаму *R. solanacearum* 5712, що ввійшов до першої серогрупи, однак зворотнього реагування – О-антисироватка шт. 5712/ЛПС шт. 767 та 7944 – не спостерігалось. Цікаво також відзначити, що О-антисироватка до шт. 7945, представника першої серогрупи, виявляє деяку спорідненість до ЛПС представника третьої серогрупи шт. 7944, О-антисироватка якого серологічно інертна до ЛПС шт. 7945.

ЛПС *R. solanacearum* штамів 8089 та 4157, структури О-ПС яких принципово відрізнялись як між собою, так і від структур вже описаних штамів, були серологічно інертними з гетерологічними О-антисироватками всіх досліджуваних штамів і навпаки, і тому були віднесені до 4 та 5 серогрупи, відповідно.

Об'єднання в одну серологічну групу передбачає наявність загальної антигенної детермінанти. За даними літератури, роль групових факторів можуть відігравати олігосахаридні фрагменти основного ланцюга. Як вважають дослідники, котрі показали наявність серологічних реакцій між *Klebsiella pneumoniae* 22535 та *Shigella flexneri* 6, дисахарид: a-L-Rha-(1@2)-a-L-Rha, який присутній в О-антигенних повторювальних ланках, може відповідати за серологічні перехресні реакції [Ansaruzzman et al., 1996].

На користь цього припущення свідчить той факт, що у О-ПС шт. 7944, представника третьої серогрупи, термінальний замісник, представлений a-L-Rha, екранує передбачувану ланку серологічно активної детермінанти і як результат знімає

серологічне навантаження з цієї ділянки. В ЛПС шт. 767, представника другої серогрупи, в О-ланцюзі присутня передбачувана серологічно активна детермінанта, однак його ЛПС залишається інертним до гетерологічних О-антисироваток досліджуваних штамів. Не виключено, що антигенна детермінанта екранується якими-то замісниками, можливо, неуглеводної природи, які не були виявлені використаними методами встановлення структури О-ПС.

Подальші дослідження були спрямовані на виявлення загальних антигенних детермінант в складі ЛПС, за рахунок яких відбувається перехресне серологічне зв'язування, для чого були використані ДСН-ПААГ- електрофорез з імуноблотингом. При проведенні ДСН-ПААГ електрофорезу визначено, що ЛПС всіх досліджуваних штамів виявляли типовий для ЛПС S-форми бімодальний розподіл і включали два типи молекул: високомолекулярний S-ЛПС з О-ланцюгами різної довжини та низькомолекулярний R-ЛПС, який не містить О-ланцюгів. Поряд з тим, вдалося виявити також менш виражений SR-ЛПС з малим числом мономерних ланок в О-ланцюзі.

Було показано, що ЛПС штамів, віднесених до однієї серогрупи, характеризувались подібним електрофоретичним розподілом, однак порівняно з іншими серогрупами – електрофоретичний розподіл був індивідуальним.

При проведенні імуноблотингу виявлені загальні закономірності перехресної реактивності антигенів одних штамів та абсолютної серологічної інертності інших щодо досліджуваних поліклональних антисироваток.

При імуноблотингу були виявлені зони серологічної активності ЛПС по відношенню до гомологічних та гетерологічних О-антисироваток. Показано, що передбачуване концентрування загальних антигенних детермінант розташовано в S- та SR-зонах ЛПС, які представлені О-ланцюгами різної довжини, а також в R-зонах ЛПС деяких штамів.

Отримані результати підтвердили розподіл досліджуваних штамів на п'ять серогруп, встановлених в вище описаних серологічних дослідженнях, і свідчили про імунохімічну гетерогенність виду *R. solanacearum*.

РОЗДІЛ 5. ДОСЛІДЖЕННЯ ТОКСИЧНОСТІ ТА ПІРОГЕННОСТІ ЛПС

Останнім часом дослідники звернули увагу на те, що ряд мікроорганізмів, які раніше вважались патогенними лише для рослин, можуть також впливати і на організм людини, оскільки, потрапляючи до нього з продуктами харчування, можуть викликати порушення імунологічної реактивності організму. Одним з таких мікроорганізмів є *R. solanacearum*, який уражає томати, картоплю, солодкий перець, соняшник, тощо – рослини, що широко вживаються людиною повсякденно. Раніше Варбанець та співавт. (1989-1991) була встановлена мітогенна, інтерферогенна, протипухлинна, антилейкозна та антиметастатична дії ЛПС *R. solanacearum*. Оскільки поряд з високою імунотропною активністю, ЛПС характеризуються токсичністю й пірогенністю, цікавим було вивчити ці показники у препаратів ЛПС досліджуваних штамів *R. solanacearum*.

Випробування пірогенної дії ЛПС 8 досліджуваних штамів проводили згідно біологічного методу якісного контролю щодо присутності бактеріальних ендотоксинів в медичних препаратах.

Для проведення порівняльної оцінки пірогенних характеристик ЛПС досліджуваних штамів в серії розведень була встановлена мінімальна пірогенна доза, яка становила $7,5 \times 10^{-3}$ мкг ЛПС / мл непірогенного ізотонічного розчину.

Результати термометрії показали, що підвищення температури у експериментальних тварин більш ніж на 0,45°C, що випадає за межі фізіологічної норми здорової тварини,

викликали розчини ЛПС штамів *R. solanacearum* 5712, 7955, 7945 та 8110. Протягом першої години їх введення призводило до різкого підвищення температури у піддослідних тварин. На другу годину спостерігалось деяке зниження температури з тенденцією до її нормалізації. І вже протягом третьої години значення температур досягали вихідних показників.

За проявом пірогенного впливу при внутрішньовенному введенні мінімальної пірогенної дози ($7,5 \cdot 10^{-3}$ мкг/мл) ці штами виявились подібними до “Пірогеналу” – фармацевтичного препарату, діючим компонентом якого є ЛПС *Shigella typhi*.

При внутрішньовенному введенні піддослідним тваринам мінімальної пірогенної дози розчинів ЛПС штамів *R. solanacearum* 767, 7944, 8089 та 4157 – підвищення температури не спостерігалось, що може свідчити про відсутність пірогенної дії ЛПС цих штамів у досліджуваній концентрації (табл. 4).

Для оцінки токсичності ЛПС досліджуваних штамів *R. solanacearum* (767, 4157, 5712, 7944, 7945, 7955, 8089 та 8110) визначали дозу препарату ЛПС, при внутрішньовенному введенні якої спостерігалась би загибель 50% піддослідних тварин (ЛД₅₀) (табл.4). ЛД₅₀ визначали в серії розведень ЛПС.

Досліджувані препарати ЛПС проявляли різний рівень токсичної активності, що відображено в показниках ЛД₅₀. За даними щодо токсичності досліджувані штами можна розділити на дві групи: більш токсичними виявились ЛПС штамів 7955, 7945, 8110 та 5712 (ЛД₅₀ 8-12 мкг/мишу), менш токсичними – ЛПС штамів 7944, 767, 4157 та 8089, ЛД₅₀ яких приблизно втричі більше (ЛД₅₀ 30-40 мкг/мишу).

Таблиця 4

ЛПС штаму ІСМР	Біологічна активність ЛПС штамів <i>R. solanacearum</i>						Середнє значення відхилення температури (?С) після введення протягом	Визначення ЛД ₅₀
	Мінімальна пірогенна доза ЛПС, яку вводили кролям, мкг/мл							
Серогрупа	1 год	2 год	3 год	мкг/мишу	г/кг			
5712	$7,5 \cdot 10^{-3}$	+0,79	+0,80	+0,20	12	0,6	1	
7945	$7,5 \cdot 10^{-3}$	+0,95	+0,5	-0,07	10	0,5		
7955	$7,5 \cdot 10^{-3}$	+1,27	+1,21	+0,81	8	0,4		
8110	$7,5 \cdot 10^{-3}$	+0,96	+0,55	+0,26	10	0,5		
767	$7,5 \cdot 10^{-3}$	+0,15	+0,11	+0,01	35	1,75	2	
7944	$7,5 \cdot 10^{-3}$	+0,30	0	-0,31	30	1,5	3	
8089	$7,5 \cdot 10^{-3}$	+0,05	+0,26	-0,08	35	1,75	4	
4157	$7,5 \cdot 10^{-3}$	+0,20	+0,20	0	40	2	5	

Як відомо, за прояв патофізіологічних реакцій в організмі ссавців, які виникають під час перебігу інфекційного процесу, викликаного грамнегативними бактеріями, відповідальна ліпід А частина молекули ЛПС. Ліпід А, представлений жирними кислотами, глюкозаміном та залишками фосфорної кислоти, є ендотоксичним центром ЛПС і обумовлює його біологічну активність, в тому числі і пірогенність та токсичність.

Вивчення жирнокислотного складу поки що не дає можливості визначити, наявність яких жирних кислот є необхідним для прояву пірогенних та токсичних властивостей, але можна припустити, що 2-ОН-С_{16:0} та 2-ОН-С_{18:0} можуть відігравати в цих

процесах певну роль. На користь цього припущення свідчать дані літератури щодо кореляції прояву біологічних властивостей ЛПС і довжиною жирних кислот його ліпиду А. Так, ЛПС *Rhodocyclus gelatinosus*, у якого обидві глюкозамінові групи несуть більш короткі порівняно з ЛПС *E. coli* жирні кислоти, виявляють менший за нього ступень пірогенності та токсичності [Brandenburg et al., 1993].

РОЗДІЛ 6. ВИВЧЕННЯ БІОЛОГІЧНОЇ АКТИВНОСТІ МОДИФІКОВАНИХ ЛПС

Висока токсичність і пірогенність ЛПС ускладнює їх впровадження в медичну практику як терапевтичних препаратів. Однак їх потужна активність та широкий спектр імуномодулюючої дії спонукає дослідників поряд з постійним пошуком нових, менш токсичних полімерів, розробляти підходи до отримання хімічно модифікованих ЛПС. Крім того, на сьогодні існує ряд запитань щодо відповідальності хімічних угруповань у складі ЛПС за прояв того чи іншого виду біологічної активності. Тому нами були отримані модифіковані препарати ЛПС типового штаму *R. solanacearum* 5712 при застосуванні фізичних (УФ-опромінення) і хімічних (О-деацильовання, N-,O-деацильовання та дефосфорильовання) методів та досліджували їх біологічну (антигенну, пірогенну та токсичну) активність.

Опромінення ультрафіолетом ЛПС типового штаму *R. solanacearum* показало, що серологічна активність корелює з часом експозиції опромінення: вплив УФ-променів на ЛПС до 15 хв. не викликав змін активності, в той час як при 30 хв. експозиції активність значно знижувалась, а після 60 хв. – повністю втрачалась. Втрата серологічної активності УФ-опромінених ЛПС можливо була обумовлена зміною конформації молекули.

Таблиця 5

Препарат	Біологічна активність модифікованих препаратів ЛПС <i>R. solanacearum</i>					
	Активність		Мінімальна пірогенна доза, мкг/мл	Середнє значення		
	токсична	пірогенна		відхилення температури (С?)	1 год	2 год
Контроль (нативний ЛПС 5712)	12	50% загинуло	7,5Ч10 ⁻³	+0,8	+0,6	+0,5
О-деацильований ЛПС	12	всі живі	7,5Ч10 ⁻³	+0,01	-0,29	-0,29
N-,O- деацильований ЛПС	12	всі живі	7,5Ч10 ⁻³	+0,28	+0,19	+0,1
Дефосфорильований ЛПС	12	всі живі	7,5Ч10 ⁻³	+0,3	+0,1	+0,06

При модифікації О-деацильованням, N-,O-деацильованням та дефосфорильованням ЛПС втрачали пірогенну та токсичну активності. Це може свідчити про те, що за пірогенність та токсичність ЛПС *R. solanacearum* відповідають як ацильні, так і фосфатні групи.

ВИСНОВКИ

- Отримано та хімічно охарактеризовано ЛПС восьми штамів *R. solanacearum*. Домінуючим моносахаридом для 7 штамів *R. solanacearum* є рамноза. ЛПС *R. solanacearum* шт. 4157 характеризувався високим вмістом арабінози. В складі ЛПС деяких штамів (ICMP 7945, 5712 та 767) була виявлена також ксилоза.
- Вперше досліджені штами *R. solanacearum* за складом жирних окисикислот ліпиду А були розподілені на дві групи: штами, що містили окисикислоти з ланцюгом від 12 до 18 атомів

- вуглецю (ICMP 5712, 7945, 7955 та 8110), та штами з меншим числом вуглецевих атомів (C10-C14) в ланцюгах жирних оксикислот (ICMP 767, 7944, 8089 і 4157).
3. Вперше на основі О-антигенності досліджувані штами *R. solanacearum*, які характеризувались 8 різними типами структури О-ПС, були віднесені до п'яти серогруп.
 4. Встановлено, що ЛПС всіх досліджуваних штамів *R. solanacearum* мають типове для ЛПС S-форми бімодальне розподілення та включають два основних типа молекул (високомолекулярний S-ЛПС, представлений О-ланцюгами різної довжини, і низькомолекулярний R-ЛПС, що не містить О-ланцюгів).
 5. Вперше для *R. solanacearum* як в гомологічних, так і в деяких гетерологічних (О-антисироватка до шт. 5712/ЛПС першої серогрупи, О-антисироватка до шт. 7945/ЛПС шт. 5712) системах виявлено переважне концентрування загальних антигенних детермінант в S-, SR- та R-зонах ЛПС.
 6. Вперше досліджувані штами *R. solanacearum* за проявом пірогенної та токсичної дії ЛПС були розподілені на дві групи: більш пірогенні та токсичні (шт. 5712, 7945, 7955 і 8110) та менш пірогенні і токсичні (шт. 767, 7944, 8089 і 4157).
 7. Вперше встановлено, що модифікація ЛПС УФ-опроміненням призводить до зниження або повної втрати (30 хв. і 60 хв., відповідно) серологічної активності.
 8. Вперше для *R. solanacearum* показано, що модифікація ліпідів А ЛПС типового штаму шляхом О-деацилування, N-,O-деацилування та дефосфорилування призводить до втрати ЛПС пірогенної та токсичної дії, що свідчить про необхідність присутності жирних кислот і фосфатних груп для прояву цих біологічних активностей.

СПИСОК РОБІТ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Вінарська Н.В., Варбанець Л.Д. Вплив УФ-опромінення на серологічну активність ліпополісахаридів *Ralstonia solanacearum* // Науковий вісник Ужгородського університету. – Серія “Біологія”. – №10. – Ужгород, 2001. – С.161-163.
2. Винарская Н.В., Варбанец Л.Д. Химическая характеристика и серологическая активность липополисахаридов *Ralstonia solanacearum* // Мікробіол. журн. – 2002. – **64**, №1. – С.37-47.
3. Варбанец Л.Д., Косенко Л.В., Васильев В.Н., Винарская Н.В., Затовская Т.В., Кислюк В.В., Лозовский В.З., Пахута Н.В. Использование лазерной спектроскопии для изучения бактериальных гликополимеров // Мікробіол. журн. – 2002. – **64**, №2. – С.11-20.
4. Варбанец Л.Д., Винарская Н.В. Структура, функция, биологическая активность эндотоксинов грамотрицательных бактерий // Современные проблемы токсикологии. – 2002. - №1. – С.33-45.
5. Віріч Н.В.*, Варбанець Л.Д., Васильєв В.Н. Серологічна специфічність ліпополісахаридів *Ralstonia solanacearum*. // Бюллетень інституту сільськогосподарської мікробіології УААН. – Чернігів, 2000. – №7. – С.24.
6. Kislyuk V.V., Varbanets L.D., Kosenko L.V., Vinarskaya N.V., Pachuta I.M. The Laser Spectroscopy of Glycopolymers // The European Material Conference, E.-MRS 2001, Strasbourg (France), 5-8 June, 2001. – Strasbourg, 2001. – P.6.
7. Varbanets L.D., Vinarskaya N.V., Vasiliev V.N., Brovarkaya O.S. Immunochemical investigations of *Ralstonia solanacearum* lipopolysaccharides // XVI International Symposium on Glycoconjugates: Abstracts (Hague, Netherlands, 19-24 August, 2001). – Hague, 2001. – P.67.
8. Varbanets L.D., Vasiliev V.N., Vinarskaya N.V., Brovarkaya O.S. Characterization of *Ralstonia solanacearum* ICMP 5712 lipopolysaccharide // 11th European carbohydrate

symposium Eurocarb XI – Book of abstracts (Lisboa, Portugal, 2-7 September, 2001). – Lisboa, 2001. – P.373.

*Прізвище Віріч змінено на Вінарська

АНОТАЦІЯ

Вінарська Н.В. Залежність біологічної активності ліпополісахаридів *Ralstonia solanacearum* (Smith, 1896) від їх складу та структурних особливостей. – Рукопис.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата наук за спеціальністю 03.00.07 – мікробіологія. – Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України, Київ, 2002.

В роботі проведено дослідження ліпополісахаридів (ЛПС) *Ralstonia solanacearum*. Отримані та хімічно охарактеризовані ЛПС 8 штамів *R. solanacearum* (ICMP 767, 4157, 5712, 7944, 7945, 7955, 8089 і 8110), які характеризувались різним типом структур О-специфічних полісахаридних ланцюгів, що були встановлені раніше. При дослідженні моносахаридного складу показано, що високий вміст рамнози є характерним для ЛПС всіх штамів, крім шт. 4157, у якого домінуючою була арабіноза. Крім того, для деяких ЛПС була характерною також ксилоза. За жирнокислотним складом ЛПС досліджуваних штамів були розподілені на дві групи: штами, що містили в ліпіді А жирні оксикислоти з ланцюгом від 12 до 18 атомів вуглецю (шт. 5712, 7945, 7955 і 8110), та штами з меншим числом вуглецевих атомів (С10-С14) в ланцюзі жирних оксикислот (шт. 767, 7944, 8089 і 4157).

При дослідженні імунохімічної активності методами кільцепреципітації, аглютинації, імуноелектрофорезу, подвійної імунодифузії в агарі за Оухтерлоні, ракетного імуноелектрофорезу, ELISA та ELISA-інгібування досліджувані штами були розподілені на підставі серологічної специфічності їх ЛПС на п'ять серогруп.

При проведенні електрофорезу в поліакріламідному гелі в системі додецилсульфату натрію (ДСН-ПААГ) визначено, що ЛПС всіх досліджуваних штамів мають типовий для ЛПС S-форми бімодальний розподіл і включають два основних типи молекул: високомолекулярну S-фракцію та низькомолекулярну R-фракцію ЛПС. Було показано, що ЛПС в межах однієї серогрупи характеризуються подібним електрофоретичним розподіленням, однак порівняно з іншими серогрупами – електрофоретичне розподілення є індивідуальним.

Імуноблотингом були виявлені зони серологічної активності ЛПС щодо гомологічних та гетерологічних О-антисироваток. Показано, що передбачуване концентрування загальних антигенних детермінант розташовано в S-, SR- та R-зонах ЛПС.

Дослідження пірогенності та токсичності (ЛД₅₀) дозволили розподілити ЛПС досліджуваних штамів на дві групи: більш пірогенні та токсичні (шт. 5712, 7945, 7955 і 8110 з ЛД₅₀ 8-12 мкг/мишу) і менш пірогенні та токсичні (шт. 767, 7944, 8089 і 4157 з ЛД₅₀ 30-40 мкг/мишу).

УФ-опромінення розчинів ЛПС показало, що антигенна активність ЛПС корелює з часом опромінення: чим довший час експозиції опромінення, тим нижчий ступінь прояву серологічної специфічності ЛПС до О-антисироватки. Модифікація ліпідів А ЛПС з використанням О-деацильовання, N-, O-деацильовання та дефосфорильовання ведуть до повної втрати токсичності та пірогенності.

Ключові слова: ліпополісахарид, серогрупи, гетерогенність, пірогенність, токсичність, модифіковані препарати ЛПС, *Ralstonia solanacearum*.

АННОТАЦИЯ

Винарская Н.В. Зависимость биологической активности липополисахаридов

***Ralstonia solanacearum* (Smith, 1896) от их состава и структурных особенностей. – Рукопись.**

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.07 – микробиология. – Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины, Киев, 2002.

В работе проведено систематическое исследование липополисахаридов (ЛПС) *Ralstonia solanacearum*. Получены и химически охарактеризованы ЛПС 8 штаммов *R. solanacearum* (ICMP 767, 4157, 5712, 7944, 7945, 7955, 8089 и 8110), которые характеризовались различным типом структур О-специфических полисахаридных цепей, установленных ранее. Изучение моносахаридного состава показало, что высокое содержание рамнозы является характерным для ЛПС всех штаммов, кроме шт.4157, у которого доминировала арабиноза. Кроме того, для некоторых ЛПС была характерной также ксилоза. При анализе жирнокислотного состава ЛПС исследованных штаммов *R. solanacearum* были разделены на две группы: штаммы, липиды А которых характеризовались присутствием жирных оксикислот с длиной цепи от 12 до 18 атомов углерода (5712, 7945, 7955 и 8110) и штаммы с меньшим числом углеродных атомов (С10 и С14) в цепи жирных оксикислот (767, 7944, 8089 и 4157).

Изучение иммунохимических свойств ЛПС проводили при использовании поликлональных О-антисывороток в качестве антител, а ЛПС использовали как антигены.

В гомологичных системах при проведении реакций агглютинации, кольцепреципитации, иммуноэлектрофореза, а также двойной иммунодиффузии в агаре по Оухтерлони было показано, что ЛПС исследованных штаммов *R. solanacearum* проявляли серологическую активность в отношении гомологичных О-антисывороток в достаточно высоких титрах (наибольшее разведение антигена или сыворотки, при которых наблюдались четко позитивные реакции, составляли 1:160000 и 1:3200 в реакциях кольцепреципитации и агглютинации, соответственно) и характеризовались сложным антигенным составом (от 1 до 3 антигенных факторов, выраженных в преципитационных линиях в реакциях двойной иммунодиффузии в агаре по Оухтерлони и иммуноэлектрофорезе).

На основании серологического родства, выявленного в гетерологических системах двойной иммунодиффузии в агаре по Оухтерлони, ракетного иммуноэлектрофореза, ELISA и ELISA-ингибирования исследованные штаммы были разделены на основании серологической специфичности их ЛПС на пять серогрупп.

При проведении электрофореза в полиакриламидном геле в системе додецилсульфата натрия (ДСН-ПААГ) определено, что ЛПС всех исследованных штаммов имеют типичное для ЛПС S-формы бимодальное распределение и включают два основных типа молекул: высокомолекулярную S-фракцию, представленную О-цепями различной длины, и низкомолекулярную R-фракцию ЛПС, которая не содержит О-цепи. Кроме того, также был выявлен менее выраженный SR-ЛПС с малым числом мономерных звеньев в О-цепи. Было показано, что ЛПС в пределах одной серогруппы характеризуются подобным электрофоретическим распределением, однако в сравнении с другими серогруппами – электрофоретическое распределение является строго индивидуальным.

Иммуноблоттингом были выявлены зоны серологической активности ЛПС по отношению к гомологичным и гетерологичным О-антисывороткам. Показано, что предположительное расположение общих антигенных детерминант находится в S-, SR- и R-зонах ЛПС. Полученные иммуноблоттингом результаты подтвердили разделение исследованных штаммов *R. solanacearum* на пять серогрупп, установленных ранее выше описанными методами, и свидетельствуют об иммунохимической гетерогенности данного вида.

Исследования пирогенности и токсичности (ЛД₅₀) позволили разделить ЛПС 8

штаммов на две группы: более пирогенные и токсичные (шт. 5712, 7945, 7955 и 8110 с ЛД₅₀ 8-12 мкг/мышь) и менее пирогенные и токсичные (шт. 767, 7944, 8089 и 4157 с ЛД₅₀ 30-40 мкг/мышь).

УФ-облучение растворов ЛПС показало, что антигенная активность ЛПС коррелирует с временем облучения: чем продолжительнее время экспозиции облучения, тем ниже степень проявления серологической специфичности ЛПС к О-антисыворотке. Модификация липидов А ЛПС путем О-деацилирования, N-,O-деацилирования и дефосфорилирования приводит к полной утрате их токсичности и пирогенности.

Ключевые слова: липополисахарид, серогруппы, гетерогенность, пирогенность, токсичность, модифицированные препараты ЛПС, *Ralstonia solanacearum*.

ABSTRACT

Vinarskaya N.V. Relationship of biological activity of *Ralstonia solanacearum* (Smith, 1896) lipopolysaccharides on their composition and structural peculiarities. – Manuscript.

The thesis for a candidate's degree by speciality 03.00.07 – microbiology. Institute of microbiology and virology named D.K. Zabolotny of National Academy of Sciences of Ukraine, Kiev, 2002.

Lipopolysaccharides (LPS) of 8 strains of *Ralstonia solanacearum* (767, 4157, 5712, 7944, 7945, 7955, 8089 and 8110) characterized by different types of structures of O-specific polysaccharide chains have been investigated. Rhamnose was the predominant monosaccharide of LPS of 7 strains tested while *R. solanacearum* 4157 LPS was characterized by high content of arabinose. Xylose was also observed in LPS of a number *R. solanacearum* strains. Analysis of fatty acids gave a possibility to divide *R. solanacearum* strains tested into two groups: the first group was represented by strains which LPS contain hydroxy-fatty acids with 12-18 carbon atoms in their chain, and the second one was characterized by shorter length of chain (C10-C14).

Using methods of ring-precipitation, agglutination, double immunodiffusion by Ouchterlony, immunoelectrophoresis and rocket immunoelectrophoresis, ELISA and ELISA-inhibition the *R. solanacearum* strains investigated were divided into five serogroups on the basis of LPS specificity.

The results of SDS-PAGE indicate LPS of all investigated strains have a typical for S-LPS bimodal distribution and include two main types of molecules: high-molecular mass S-fraction and low-molecular mass R-fraction of LPS. It was shown that LPS one and the same serogroup are characterized by similar electrophoretic distribution, while in compare with others serogroups - electrophoretic distribution was strictly individual.

Immunoblotting analysis indicated the zones of serological activity of LPS with respect to homological and heterological antiserum. It was shown the expected arrangement of common antigenic determinants in S-, SR- and R-zones of LPS.

On the basis of LPS pyrogenicity and toxicity (LD₅₀) *R. solanacearum* strains were divided into two groups: more pyrogenic and toxic (5712, 7945, 7955 and 8110 - LD₅₀ 8-12 mg/mouse) and less pyrogenic and toxic (767, 7944, 8089 and 4157 - LD₅₀ 30-40 mg/mouse).

UV-impact of LPS solutions showed the antigenic activity of LPS correlated with time of irradiation: the increase of irradiation exposition time leads to decrease of serological specificity of LPS to O-antiserum.

Modification of lipid A by O-deacylation, N-,O- deacylation and dephosphorylation causes the complete loss of their toxicity and pyrogenicity.

Key words: lipopolysaccharide, serogroups, heterogeneity, pyrogenicity, toxicity, modified LPS, *Ralstonia solanacearum*.