

УДК 577.115.7:579.842.1/2

# АКТИВНІСТЬ НАТИВНИХ І МОДИФІКОВАНИХ ЛІПОПОЛІСАХАРИДІВ *Rahnella aquatilis*

Л. Д. Варбанець<sup>1</sup>Л. Б. Скоклюк<sup>1</sup>В. В. Шубчинський<sup>1</sup>І. І. Сейфулліна<sup>2</sup>Н. В. Шматкова<sup>2</sup>С. І. Похил<sup>3</sup><sup>1</sup>Інститут мікробіології і вірусології ім. Д. К. Заболотного НАН України, Київ<sup>2</sup>Одеський національний університет ім. І. І. Мечникова<sup>3</sup>Інститут мікробіології та імунології ім. І. І. Мечникова АМН України, Харків

E-mail: varbanets@serv.imv.kiev.ua

Результати порівняльних досліджень токсичності нативних і модифікованих комплексними сполуками германію або олова ліпополісахаридів (ЛПС) *Rahnella aquatilis* штамів 95U004, 95U011 і 96U035 свідчать, що внаслідок модифікації ЛПС комплексом германію (IV) з нікотиноілгідразоном саліцилового альдегіду спостерігається зниження токсичності всіх досліджуваних ЛПС. Взаємодія ЛПС із комплексом олова (IV) з нікотиноілгідразоном саліцилового альдегіду зумовлювала зниження токсичності тільки ЛПС *R. aquatilis* 95U004. У процесі вивчення пірогенної дії нативних і модифікованих ЛПС не встановлено певної закономірності в дії модифікуючих речовин, більшість із яких спричинювали зниження пірогенної дії. Майже всі модифікації не впливали на антигенну активність ЛПС трьох досліджуваних штамів *R. aquatilis* 95U004, 95U011 і 96U035 як у гомологічних, так і в гетерологічних системах. Винятки становили модифікований комплексом олова (IV) з нікотиноілгідразоном саліцилового альдегіду ЛПС *R. aquatilis* 95U004, який втратив серологічну активність щодо антисироватки до типового штаму *R. aquatilis* ATCC 33071, а також модифіковані комплексом германію (IV) з нікотиноілгідразоном саліцилового альдегіду і комплексом олова (IV) з 2-амінобензоілгідразоном саліцилового альдегіду ЛПС *R. aquatilis* 96U035, які втратили серологічну активність як з гомологічною, так і з гетерологічними антисироватками до інших представників третьої серогрупи.

**Ключові слова:** ліпополісахарид, *Rahnella aquatilis*, комплексні сполуки германію й олова, токсичність, пірогенність.

Відомо, що основою захисту тварин від бактерій є вроджений імунітет, водночас єдиною можливістю захисту бактерій від факторів імунної системи є експресія чинників патогенності, які виконують функції як захисту, так і нападу. Одним із чинників патогенності є ліпополісахарид (ЛПС) — компонент зовнішньої мембрани, який міститься на клітинній поверхні грамнегативних бактерій. Йому притаманна плейотропна та поліфункціональна дія, що забезпечує як стимуляцію імунітету, так і захист бактерій від системи імунітету. Однак застосування ЛПС у медичній практиці упродовж багатьох років було обмежено через їхню токсичність, пірогенність та інші побічні ефекти [1]. Тому розроблення методів і підходів для хімічної модифікації ЛПС з метою одержання препаратів, які втрачають токсичність і пірогенність, але зберігають імуно-

дулюючі властивості, є надзвичайно важливим для створення на основі таких препаратів вакцин нового покоління. Одним із шляхів детоксикації ЛПС є їх хімічна модифікація. Тому метою цієї роботи було провести хімічну модифікацію ЛПС деякими сполуками германію та олова і встановити, як вона впливає на їхню антигенну активність і токсичність.

## Матеріали і методи

Об'єктом дослідження були штами *Rahnella aquatilis*, одержані з колекції лабораторії експериментальної прикладної молекулярної діагностики (ЛЕПМД) Інституту мікробіології та імунології ім. І. І. Мечникова АМН України (табл. 1).

Культури вирощували на синтетичному рідкому середовищі N [2], в умовах орбітального

шейкера (220 об/хв) при температурі 28 °С, упродовж 24 год. Виділення та очищення ліпополісахаридів проводили, як описано раніше [3].

Таблиця 1. Джерела виділення штамів *R. aquatilis*

Штами <i>R. aquatilis</i> , ЛЕПМД	Джерело виділення
95U004	Випорожнення людей, хворих на діарею
95U011	Ризосфера рослин
96U035	Вода відкритих водоймищ

Примітка. ЛЕПМД — лабораторія експериментально-прикладної молекулярної діагностики

Антисироватки до нагрітих (100 °С, протягом 2,5 год) клітин *R. aquatilis* отримували з крові імунізованих кролів. Імунізацію проводили шляхом п'ятиразового внутрішньовенного введення в кров кролів розчинів зі зростаючими концентраціями (від  $1 \cdot 10^7$  до  $16 \cdot 10^8$ ) клітин *R. aquatilis* з інтервалами між ін'єкціями 7 діб. Забір крові проводили на 7-му добу після останньої імунізації [4].

Антигенну активність ЛПС досліджували подвійною імунодифузією в агарі за методом Оухтерлоні [5].

Пірогенну дію ЛПС вивчали на кролях масою 2,0–3,5 кг [4]. Термометрію проводили за допомогою електронного термометра (Omron Matsusaka Co. Ltd, Японія), який вводили в пряму кишку на глибину 5–7 см (залежно від маси кроля). Попередньо всіх кролів випробовували на імунореактивність шляхом внутрішньовенного введення 10 мл/кг 0,9%-го стерильного непірогенного розчину хлориду натрію. Досліджувані препарати ЛПС розчиняли в стерильному непірогенному ізотонічному розчині, перед введенням витримували протягом 10 хв при 37 °С, після чого внутрішньовенно вводили з розрахунку 1 мл/кг маси тварини. Мінімальну пірогенну дозу препаратів ЛПС визначали в серії розведень від  $7,5 \cdot 10^{-3}$  до  $1,0 \cdot 10^{-2}$  мг/мл. Кожну серію досліджуваних розчинів перевіряли на трьох кролях, близьких за масою (різниця не більш ніж 0,5 кг). Перед введенням розчину ЛПС у кролів двічі вимірювали температуру з інтервалом 30 хв. Оскільки різниця в показниках температури не мала перевищувати 0,2 °С, тварин, що не відповідали цьому показникові, для дослідження не використовували. Результат останнього вимірювання приймали за вихідну температуру. Розчин ЛПС вводили не пізніше ніж через 15–20 хв після останнього вимірювання температури. Наступні вимірювання про-

водили після введення препарату тричі з проміжками в 1 год. Досліджуваний розчин ЛПС вважали непірогенним, якщо сума підвищених температур у трьох кролів була меншою або дорівнювала 1,4 °С. Експеримент виконували в трьох повторностях.

Токсичність ЛПС визначали на здорових білих мишах масою 19–21 г обох статей, раніше не задіяних у будь-яких дослідженнях. Усім мишам вводили внутрішньочеревинно 0,5 мл 3,2%-го розчину D-галактозамінгідрохлориду в непірогенному стерильному розчині 0,9%-го NaCl, після чого негайно вводили внутрішньочеревинно 0,2 мл підігрітого до 37 °С ЛПС в ізотонічному стерильному непірогенному фізіологічному розчині зі швидкістю 0,1 мл/с. У серії розведень ЛПС визначали дозу препарату, що спричинювала загибель 50% дослідних тварин ( $LD_{50}$ ), яку використовували для оцінки токсичності ЛПС. Кожну серію розведень препарату ЛПС випробовували на 10 мишах. Контрольній групі (10 мишей) вводили разом з D-галактозамінгідрохлоридом 0,2 мл стерильного розчину 0,9%-го NaCl. Спостереження за тваринами здійснювали упродовж 48 год [4].

Для одержання модифікованих комплексів германію (I–III) та олова (IV–VI) (рис. 1) ЛПС було розроблено таку методику. Спочатку при кімнатній температурі готували робочі розчини I–VI у диметилсульфоксиді (ДМСО) з молярною концентрацією  $2,41 \cdot 10^{-2}$  моль/л ( $V$  розчину 4 мл) та ЛПС у суміші  $H_2O$  : ДМСО = 1 : 3 з концентрацією  $\sim 4,8 \cdot 10^{-4}$  моль/л, якщо прийняти  $M$  (ЛПС)  $\sim 20\,000$  моль/л (маса ЛПС 035 (011, 004) = 28,8 мг,  $V$  розчину = 3 мл). Модифікацію виконували, заливаючи певні об'єми робочих розчинів ЛПС і комплексів I–VI так, щоб скрізь було витримано співвідношення у молях  $v(\text{ЛПС})$  :  $v(\text{I–VI}) = 1$  : 20. Усі отримані суміші герметично закривали та витримували протягом 2 год при температурі 80 °С до одержання істинних розчинів. Їхній об'єм після охолодження до  $t_{\text{кімн.}}$  доводили до 2 мл диметилсульфоксидом для отримання розчинних зразків [ $v(\text{ЛПС})$  :  $v(\text{I–VI}) = 1,5 \cdot 10^{-7}$  моль :  $3,0 \cdot 10^{-6}$  моль] або продовжували їх нагрівання при 80 °С для ізоляції з одержаних концентрованих розчинів кристалічних зразків [ $v(\text{ЛПС})$  :  $v(\text{I–VI}) = 1,0 \cdot 10^{-7}$  моль :  $2 \cdot 10^{-6}$  моль]. Співвідношення ЛПС та комплексу для кожної отриманої реакційної суміші наведено в табл. 2.

ІЧ-спектри поглинання ( $350$ – $4\,000\text{ см}^{-1}$ ) зразків, таблетованих з KBr, записували на спектрофотометрі Specord 75 IR та Shimadzu FTIR-8400S.

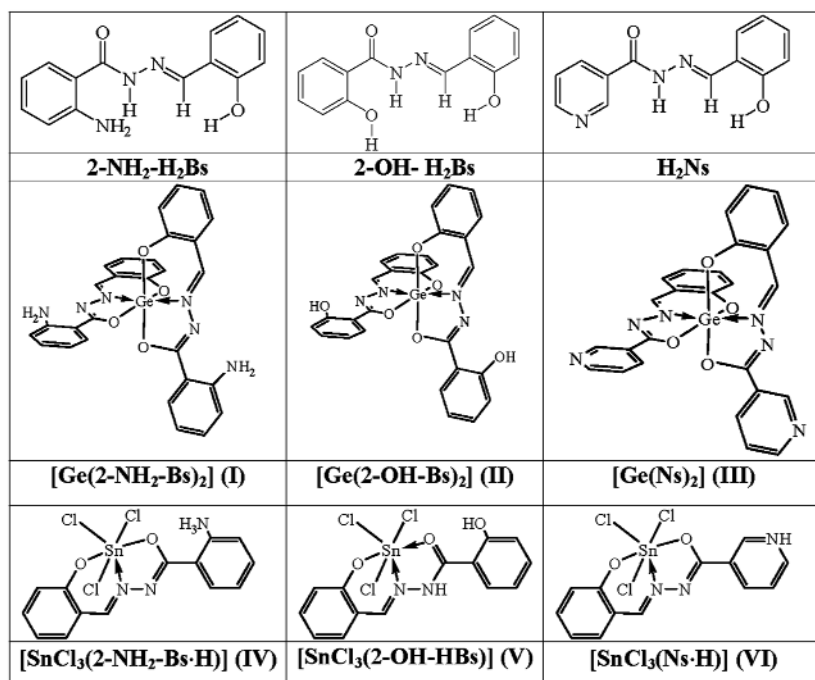


Рис. 1. Схема будови гідразонів і відповідних комплексів германію (I–III) та олова (IV–VI):

Модифікуючі комплекси:

I — комплекс германію (IV) з 2-амінобензоїлгідразоном саліцилового альдегіду (2-NH<sub>2</sub>-H<sub>2</sub>Bs):M([Ge(2-NH<sub>2</sub>-Bs)<sub>2</sub>]) = 578,6 г/моль;II — комплекс германію (IV) з 2-гідроксибензоїлгідразоном саліцилового альдегіду (2-OH-H<sub>2</sub>Bs):M([Ge(2-OH-Bs)<sub>2</sub>]) = 580,6 г/моль;III — комплекс германію (IV) з нікотиноїлгідразоном саліцилового альдегіду (H<sub>2</sub>Ns):M([Ge(Ns)<sub>2</sub>]) = 550,6 г/моль;IV — комплекс олова (IV) з 2-амінобензоїлгідразоном саліцилового альдегіду (2-NH<sub>2</sub>-H<sub>2</sub>Bs):M([SnCl<sub>3</sub>(2-NH<sub>2</sub>-Bs-H)]) = 479,2 г/моль;V — комплекс олова (IV) з 2-гідроксибензоїлгідразоном саліцилового альдегіду (2-OH-H<sub>2</sub>Bs):M([SnCl<sub>3</sub>(2-OH-HBs)]) = 480,2 г/моль;VI — комплекс олова (IV) з нікотиноїлгідразоном саліцилового альдегіду (H<sub>2</sub>Ns):M([SnCl<sub>3</sub>(Ns-H)]) = 465,2 г/моль

Таблиця 2. Співвідношення компонентів у розчині (V = 2 мл)

№ модифікованих ЛПС	Вроб. розчину ЛПС	Вроб. розчину комплексу	Співвідношення ЛПС: комплекс (I–VI)
035(I)	0,5	0,20	035: I = 4,80мг : 2,79 мг
035(II)	0,5	0,20	035 : II = 4,80мг : 2,80 мг
035(III)	0,5	0,20	035: III = 4,80мг : 2,66 мг
035(IV)	0,5	0,20	035: IV = 4,80 мг : 2,31 мг
035(V)	0,5	0,20	035 : V = 4,80 мг : 2,32 мг
035(VI)	0,5	0,20	035 : VI = 4,80 мг : 2,25 мг
011(I)	0,5	0,20	011: I = 4,80 мг : 2,79 мг
011(II)	0,5	0,20	011 : II = 4,80 мг : 2,80 мг
011(III)	0,5	0,20	011: III = 4,80 мг : 2,66 мг
011(IV)	0,5	0,20	011: IV = 4,80 мг : 2,31 мг
011(V)	0,5	0,20	011 : V = 4,80 мг : 2,32 мг
011(VI)	0,5	0,20	011 : VI = 4,80 мг : 2,25 мг
004(I)	0,31	0,125	004 : I = 2,98 мг : 1,74 мг
004(II)	0,31	0,125	004 : II = 2,98 мг : 1,74 мг
004(III)	0,31	0,125	004: III = 2,98 мг : 1,65 мг
004(IV)	0,31	0,125	004: IV = 2,98 мг : 1,44 мг
004(V)	0,31	0,125	004 : V = 2,98 мг : 1,44 мг
004(VI)	0,31	0,125	004 : VI = 2,98 мг : 1,40 мг

### Результати та обговорення

Відомо [6], що ЛПС грамнегативних бактерій становлять складну молекулу, яка містить такі структурні компоненти, як О-специфічний полісахарид (ОПС), олігосахарид кору та ліпід А. Саме ліпід А є ендотоксичним центром молекули ЛПС, що відповідає за такі властивості, як токсичність і пірогенність. Для оцінювання гострої токсичності ЛПС вивчали дозу препарату, яка в разі внутрішньоочеревинного введення мишам, сенсibilізованих D-галактозаміногідрохлоридом, спричинювала загибель 50% дослідних тварин ( $LD_{50}$ ). Досліджувані препарати ЛПС виявляли токсичність у дозі 50 мкг/мишу, що відображено у показниках гострої токсичності  $LD_{50}$  (табл. 3). Слід зазначити, що одержані результати свідчать про меншу токсичність досліджуваних нами ЛПС *R. aquatilis* 95U004, 95U011 і 96U035 порівняно з ЛПС таких представників *Enterobacteriaceae*, як *Escherichia coli* O55:B5, який було використано для порівняння ( $LD_{50}$  0,14 мкг/мишу), а також раніше вивченими штамми *R. aquatilis* 1-95, 2-95, 3-95, 3-88, 2-87, 33071 [7], у яких показник  $LD_{50}$  коливався у межах від 3,6 до 5,0 мкг/мишу залежно від штаму. Разом з тим ЛПС *R. aquatilis* штамів 95U004, 95U011 і 96U035 за своєю токсичністю були схожі з ЛПС *Pragia fontium*,  $LD_{50}$  яких становив від 30 до 75 мкг/мишу [8].

Таблиця 3. Гостра токсичність ( $LD_{50}$ ) нативних і модифікованих ЛПС *R. aquatilis*

Штам <i>R. aquatilis</i>	Нативні ЛПС		ЛПС, модифіковані речовинами:			
			III		VI	
	мкг/мишу	г/кг	мкг/мишу	г/кг	мкг/мишу	г/кг
95U004	70	4,66	>70	>4,66	>70	>4,66
95U011	50	3,33	>50	>3,33	>50	>3,33
96U035	50	3,33	>50	>3,33	>50	>3,33

Окрім токсичності, ЛПС виявляють також і пірогенність. Внутрішньовенне введення ЛПС людині або кролям, які є найбільш чутливими до пірогенної дії ЛПС [9], супроводжується підвищенням через певний період часу температури тіла. Для проведення порівняльної оцінки пірогенних характеристик було встановлено мінімальну пірогенну дозу ЛПС —  $7,5 \cdot 10^{-3}$  мкг/мл непірогенного ізотонічного розчину. Результати термометрії свідчать, що підвищення температури в експериментальних тварин більш

ніж на 0,45 °C (а це виходить за межі фізіологічної норми здорових тварин) спричинювали розчини ЛПС усіх трьох досліджуваних штамів *R. aquatilis* 95U011, 96U035 та 95U004. Найбільш пірогенним виявився ЛПС *R. aquatilis* 95U011, а найменш пірогенним — *R. aquatilis* 95U004 (рис. 2). Їхня пірогенність була більшою порівняно з активністю пірогеналу — фармацевтичного препарату, діючим компонентом якого є ЛПС *Shigella typhi*.

Одним із шляхів зміни біологічних властивостей ЛПС є хімічна модифікація. Як модифікатори було використано комплекси германію (IV) та олова (IV) з 2-амінобензоїлгідразоном саліцилового альдегіду (I і IV, відповідно), 2-гідроксибензоїлгідразоном саліцилового альдегіду (II і V, відповідно) та нікотиноїлгідразоном саліцилового альдегіду (III і VI, відповідно). Одержання модифікованих ЛПС було доведено шляхом порівняння ІЧ-спектрів нативного ЛПС *R. aquatilis* 004 з кристалічними зразками 004 (I)–004 (VI), які ізолювано з концентрованих розчинів унаслідок їх подальшого нагрівання при 80 °C. ІЧ-спектр ЛПС 004 (рис. 3) характеризується рядом інтенсивних смуг, що є відповідальними за різні типи коливань груп моносахаридів і жирних кислот. Так, у високочастотній області спектра є широка смуга в ділянці 3 700–3 100  $cm^{-1}$  з максимумом при 3 448  $cm^{-1}$ , характерна для  $\nu(OH)$  і  $\nu(NH)$ , а також ряд смуг при 2 921 і 2 852  $cm^{-1}$ , відповідальних за  $\nu(CH)$ . В області 1 580–1 740  $cm^{-1}$  спостерігаються дві широкі смуги з максимумами при 1 730  $cm^{-1}$  і 1 623  $cm^{-1}$ , які відповідають коливанням  $\nu(C=O)$  альдегідних або кетогруп ЛПС, а також  $[v_{as}(COO^-) + \delta(NH)]$ . Інші коливання, характерні для кислот, проявляються при 1 420  $cm^{-1}$  ( $v_s(COO^-)$ ), 1 242  $cm^{-1}$  ( $\nu(P=O)$ ) і 1 072  $cm^{-1}$  ( $\nu(P-O-C)$ ). Окрім того, в ділянці 1 200–1 500  $cm^{-1}$  є ряд смуг різних видів деформаційних коливань  $\delta(CH)$ ,  $\delta(OH)$ ,  $\delta(COH)$ , зокрема, при 1413 —  $\delta(CH_2)$  і 1380 —  $\delta(CH_3)$ . Смуги, типові для вуглеводів загалом, проявляються у вигляді широкого плеча в області 960–1 100  $cm^{-1}$ . Смуги низької інтенсивності при 914 і 894  $cm^{-1}$  характеризують реалізацію  $\beta$ -форми моносахариду в складі ЛПС. В ІЧ-спектрах кристалічних зразків модифікованого ЛПС *R. aquatilis* 004 з комплексами як Ge(IV) — I–III, так і Sn(IV) — (IV–VI) практично зберігається широка смуга у високочастотній області, однак змінюється її максимум: у випадку комплексів I, II, IV, V він підвищується, ймовірно, через залучення  $NH_2$ -,  $NH$ -,  $OH$ - груп у міжмолекулярну взаємодію за рахунок модифікації.



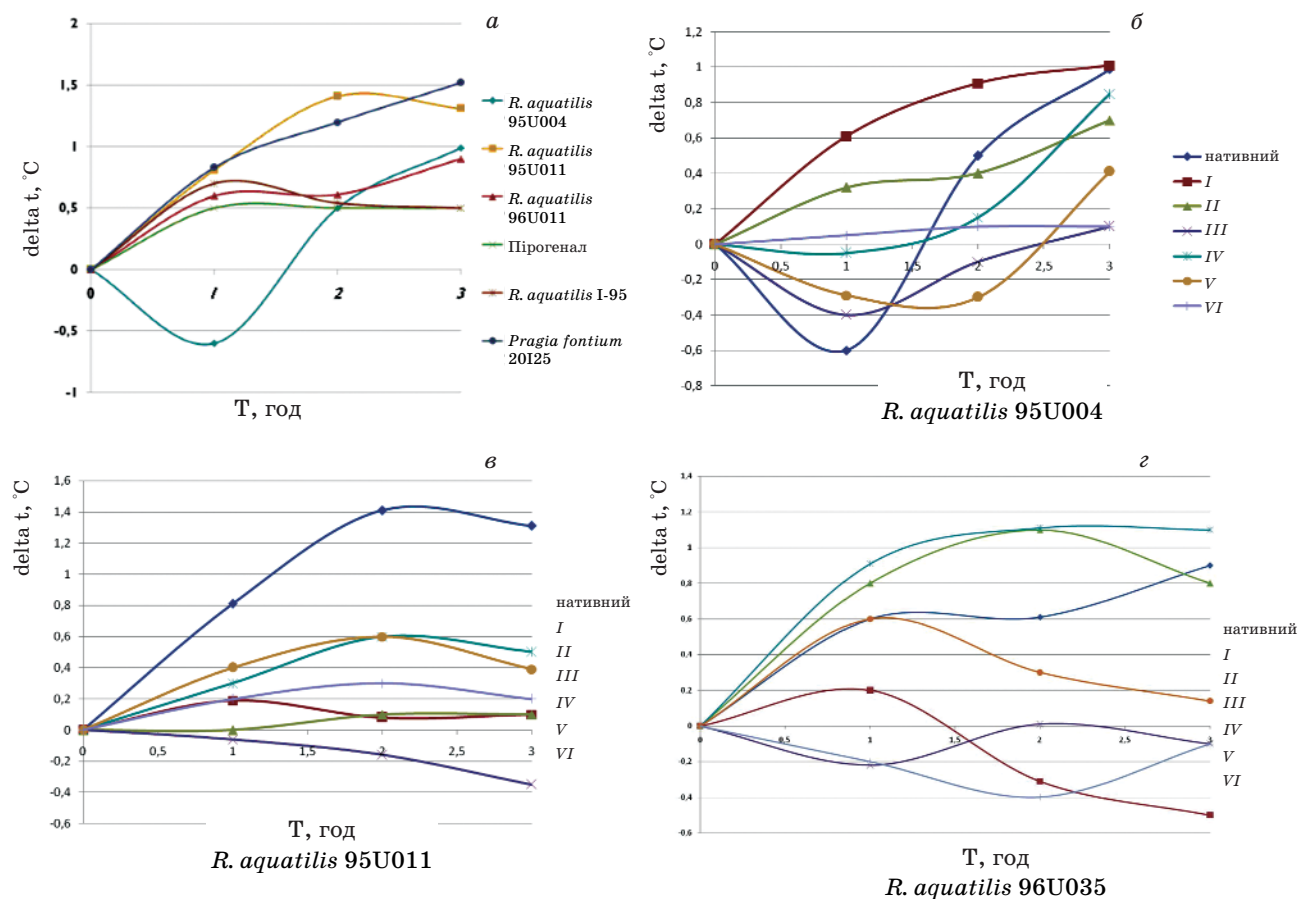


Рис. 2. Пірогенність нативних (а) і модифікованих (б, в, г) ЛПС *R. aquatilis*

Спостерігається підвищення числа характеристичних частот в області  $1\ 635\text{--}1\ 150\text{ см}^{-1}$ , які відповідають як коливанням функціональних груп ЛПС ( $\text{C}=\text{O}$ ,  $\text{P}=\text{O}$ ,  $\text{P}-\text{O}-\text{C}$ ,  $\nu_{\text{s/as}}(\text{COO}^-)$ ,  $\text{C}-\text{O}$ ,  $\delta(\text{NH})$  і  $\delta(\text{OH})$ ), так і комплексів у складі модифікованих зразків ( $\nu(\text{OH})$ ,  $\nu(\text{NH})$ ,  $\nu(\text{C}=\text{O})$ ,  $\nu(\text{C}=\text{N})$ ). Ці частоти зміщуються в низькочастотну область на  $10\text{--}15\text{ см}^{-1}$  порівняно з частотами в ІЧ-спектрах вихідних сполук унаслідок взаємодій, чутливих до змін водневих зв'язків. Утворення нових супрамолекулярних комплексів супроводжується викривленням октаедричного поліедру германію й олова, збільшенням довжин зв'язків  $\text{Ge}-\text{O}$ ,  $\text{Ge}-\text{N}$  і зменшенням частоти їх коливань на  $10\text{--}15\text{ см}^{-1}$ ; у комплексах I–III вони становлять  $\nu(\text{Ge}-\text{O}) = 670$  (I),  $710$  (II),  $683\text{ см}^{-1}$  (III),  $\nu(\text{Ge}-\text{N}) = 640$  (I),  $630$  (II),  $626\text{ см}^{-1}$  (III), а в комплексах IV–VI  $\nu(\text{Sn}-\text{O}) = 453$  (IV),  $448$  (V),  $458\text{ см}^{-1}$  (VI),  $\nu(\text{Sn}-\text{N}) = 430$  (IV),  $436$  (V),  $440\text{ см}^{-1}$  (VI).

Таким чином, аналіз ІЧ-спектрів свідчить, що нами одержано модифіковані форми ЛПС. Чи змінилась біологічна актив-

ність ЛПС після таких модифікацій і якщо змінилась, то як?

Результати порівняльних досліджень токсичності нативних і модифікованих ЛПС *R. aquatilis* штамів 95U004, 95U011 і 96U035 (табл. 3) свідчать, що внаслідок модифікації ЛПС комплексом III спостерігається зниження токсичності всіх досліджуваних ЛПС. Взаємодія ЛПС із комплексом VI знижувала токсичність тільки ЛПС *R. aquatilis* 95U004.

У процесі вивчення пірогенної дії нативних і модифікованих ЛПС не встановлено певної закономірності в дії модифікуючих речовин. Так, сполуки III, V і VI, сполуки I, II, III і VI, а також I, III, IV і V сприяли втраті пірогенності ЛПС *R. aquatilis* штамів 95U004, 95U011 і 96U035, відповідно. Тобто можна зробити такі висновки: 1) сполука III — комплекс германію з нікотинільгідразоном саліцилового альдегіду виявляв універсальну дію щодо зниження пірогенності ЛПС усіх трьох досліджуваних штамів *R. aquatilis*; 2) усі досліджувані сполуки здатні знімати пірогенну дію ЛПС, але різною мірою. Це

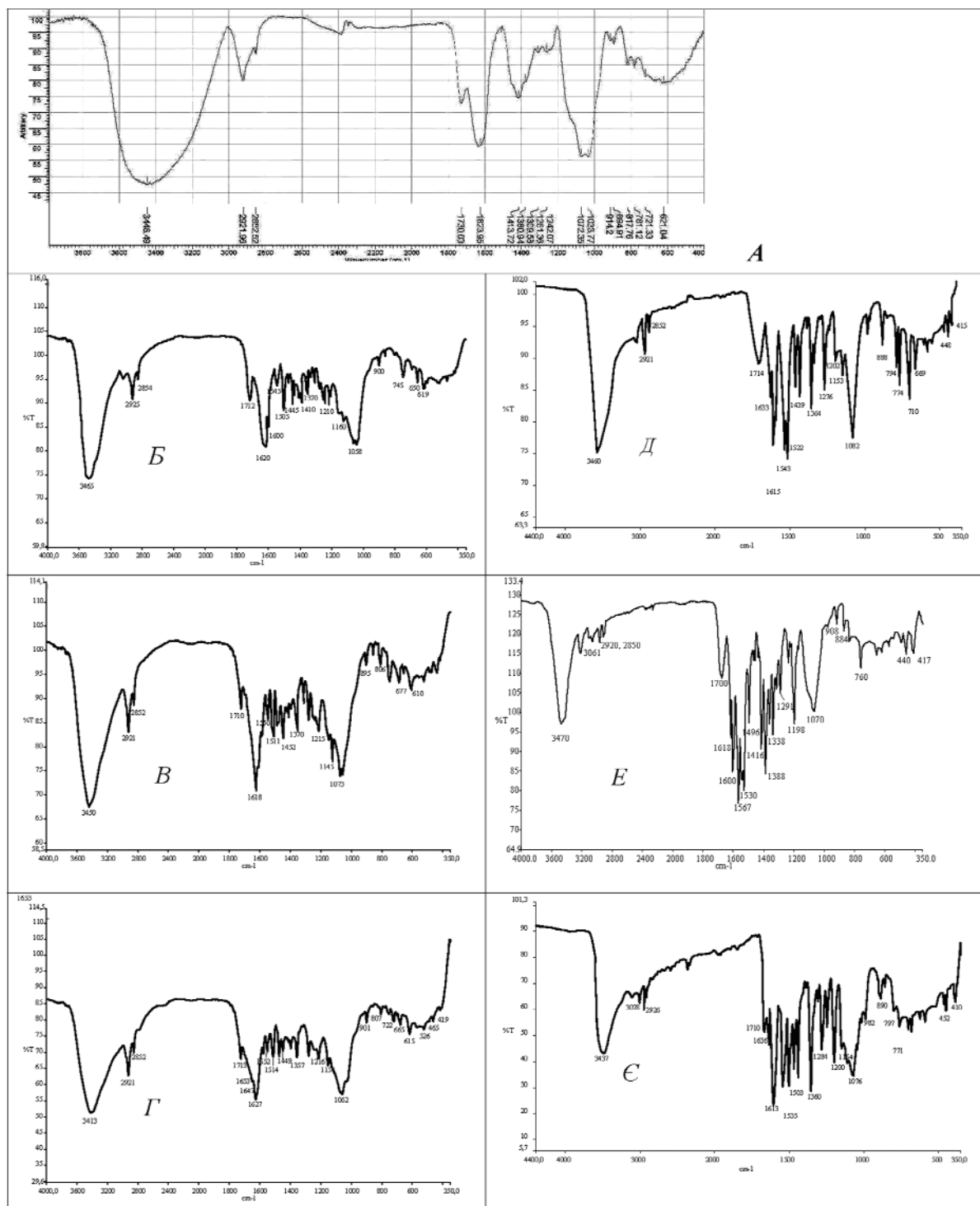


Рис. 3. ІЧ-спектри А — ЛПС(004) та зразків модифікованих ним комплексів (І–VI): Б — 004(І), В — 004(ІІ), Г — 004(ІІІ), Д — 004(ІV), Е — 004(V), Є — 004(VI)

може бути зумовлено особливостями структури ліпідів А, які відповідають за ендотоксичну активність.

Оскільки механізм дії модифікуючих сполук на молекулу ЛПС невідомий, було вивчено також їх вплив на серологічну ак-

тивність ЛПС (рис. 4, 5, 6). У цьому разі майже всі модифікації не впливали на антигенну активність ЛПС трьох досліджуваних штамів *R. aquatilis* 95U004, 95U011 і 96U035 як у гомологічних, так і в гетерологічних системах. Винятки становили модифікова-

ний комплекс стануму (IV) з нікотиноїлгідразом саліцилового альдегіду ЛПС *R. aquatilis* 95U004, який втратив серологічну активність щодо антисироватки до типового штаму *R. aquatilis* ATCC 33071, а також модифіковані комплексом германію (IV) з нікотиноїлгідразом саліцилового альдегіду і комплексом стануму (IV) з 2-амінобензоїлгідразом саліцилового альдегіду ЛПС *R. aquatilis* 96U035, які втратили серологічну активність як із гомологічною, так і з гетерологічними антисироватками до інших представників третьої серогрупи.

Дані, отримані під час вивчення дії модифікуючих речовин I, II і III на пірогенну і серологічну активність ЛПС *R. aquatilis* відрізняються від отриманих раніше [8] да-

них щодо впливу їх на ЛПС іншого представника родини *Enterobacteriaceae* — *P. fontium*. Було встановлено, що модифіковані цими речовинами ЛПС *P. fontium*, на відміну від нативних, повністю втратили антигенну активність. Що стосується пірогенної дії, то тільки один ЛПС *P. fontium* 20125, модифікований комплексом германію з 2-гідробензоїлгідразом саліцилового альдегіду, втратив пірогенну дію. Різна дія одних і тих самих модифікуючих речовин на ЛПС *R. aquatilis* і *P. fontium* свідчить про відмінності їхнього складу, тобто про наявність у них груп, тільки деякі з яких можуть взаємодіяти з дослідженими модифікуючими речовинами.

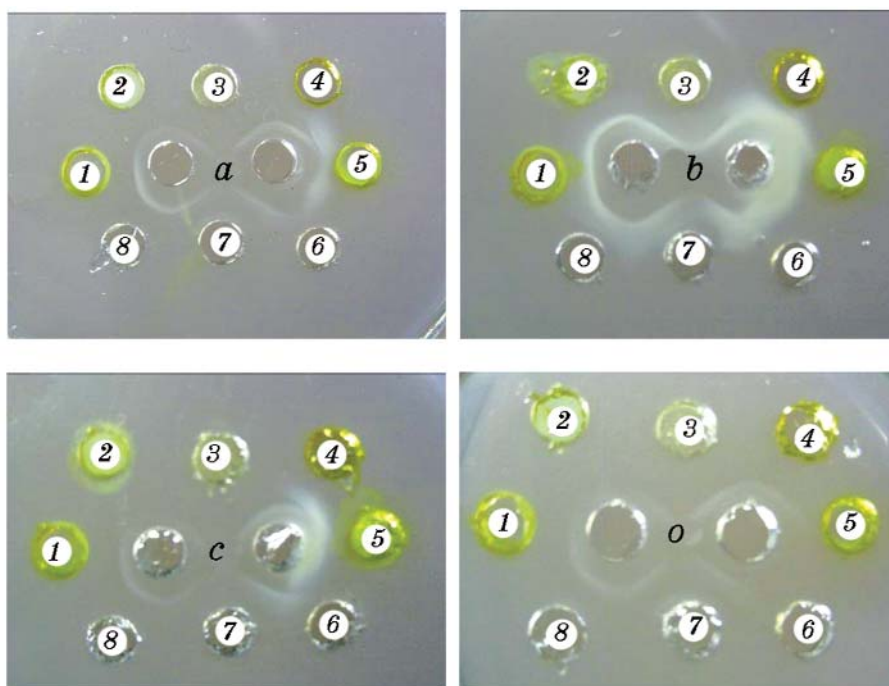


Рис. 4. Реакція подвійної імунодифузії в агарі за Оухтерлоні нативних (7, 8) та модифікованих (1–6) ЛПС *R. aquatilis* 95U004 з антисироватками до штамів: а — 95U003, б — 95U004, с — 95U007, о — ATCC33071

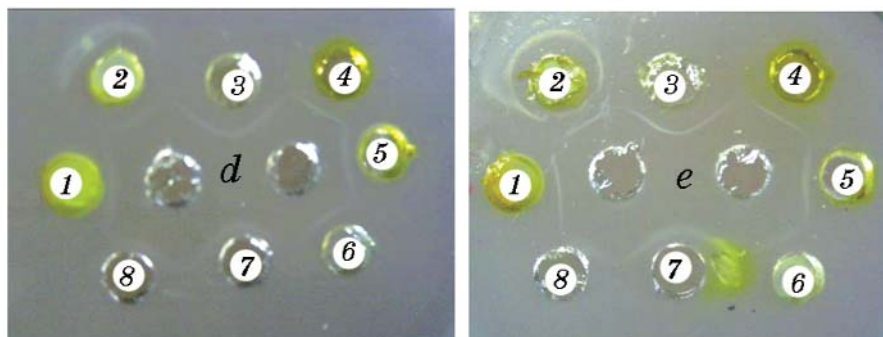


Рис. 5. Реакція подвійної імунодифузії в агарі за Оухтерлоні нативних (7, 8) та модифікованих (1–6) ЛПС *R. aquatilis* 95U011 з антисироватками до штамів: d — 95U011, e — 95U012



Рис. 6. Реакція подвійної імунодифузії в агарі за Оухтерлоні нативних (7, 8) та модифікованих (1–6) ЛПС *R. aquatilis* 96U035 з антисироватками до штамів: *f* — 96U035, *h* — 96U036, *j* — 96U037

Таким чином, отримані результати свідчать, що досліджувані модифікуючі речовини здатні взаємодіяти як з певними компонентами О-специфічного полісахариду, який відповідає за серологічну специфічність бактеріальної клітини, так і з певними

хімічними групами ліпідів ЛПС *R. aquatilis* 95U004, 95U011 та 96U035 і можуть бути використані для одержання непірогенних форм ЛПС. Імовірно, що групи, які відповідають за токсичність і пірогенність ЛПС різних штамів *R. aquatilis*, різні.

## ЛІТЕРАТУРА

1. Лазарева Д. Н., Алехин А. К. Стимуляторы иммунитета. — М: Медицина, 1985. — 255 с.
2. Vidaver A. Synthetic and complex media for the rapid detection of fluorescence and phytopathogenic pseudomonas: effect of carbon source // Appl. Microbiol. — 1967. — V. 15, N 6. — P. 1523–1524.
3. Варбанец Л. Д., Остапчук А. Н., Похил С. И. Характеристика структурных компонентов липополисахаридов *R. aquatilis* // Мікробіол. журн. — 2004. — Т. 66, № 4. — С. 13–22.
4. Варбанец Л. Д., Здоровенко Г. М., Книрель Ю. А. Методы исследования эндотоксинов. — К.: Наук. думка, 2006. — 237 с.
5. Ouchterlony O. Diffusion in gel methods for immunological analysis // Progr. Allergy. — 1962. — N 6. — P. 3–15.
6. Raetz C. R. H., Whitfield C. Lipopolysaccharide endotoxins // Annu. Rev. Biochem. — 2002. — N 71. — P. 635–700.
7. Остапчук А. М., Варбанец Л. Д. Биологическая активность нативных модифицированных липополисахаридов *R. aquatilis* // Мікробіол. журн. — 2004. — Т. 66, № 6. — С. 31–36.
8. Варбанец Л. Д., Шубчинський В. В., Похил С. І. та ін. Біологічна активність нативних і модифікованих ліпополісахаридів *Pragia fontium* // Укр. біохім. журн. — 2009. — Т. 81, № 1. — С. 321–340.
9. Wolff S. M. Biological effects of bacterial endotoxins in man // J. Infect Dis. — 1973. — V. 128, N 1. — Suppl:259–264.



# АКТИВНОСТЬ НАТИВНЫХ И МОДИФИЦИРОВАННЫХ ЛИПОПОЛИСАХАРИДОВ *Rahnella aquatilis*

Л. Д. Варбанец<sup>1</sup>  
Л. Б. Скоклюк<sup>1</sup>  
В. В. Шубчинский<sup>1</sup>  
И. И. Сейфуллина<sup>2</sup>  
Н. В. Шматкова<sup>2</sup>  
С. И. Похил<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Институт микробиологии и вирусологии  
им. Д. К. Заболотного НАН Украины, Киев

<sup>2</sup>Одесский национальный университет  
им. И. И. Мечникова

<sup>3</sup>Институт микробиологии и иммунологии  
им. И. И. Мечникова АМН Украины, Харьков

E-mail: varbanets@serv.imv.kiev.ua

Результаты сравнительных исследований токсичности нативных и модифицированных комплексными соединениями германия или олова липополисахаридов (ЛПС) *Rahnella aquatilis* штаммов 95U004, 95U011 и 96U035 свидетельствуют, что вследствие модификации ЛПС комплексом германия (IV) с никотиноилгидразоном салицилового альдегида наблюдается снижение токсичности всех исследованных ЛПС. Взаимодействие ЛПС с комплексом олова (IV) с никотиноилгидразоном салицилового альдегида приводило к снижению токсичности только ЛПС *R. aquatilis* 95U004. При изучении пирогенного действия нативных и модифицированных ЛПС не установлено определенной закономерности в действии модифицирующих веществ, большинство из которых вызывало снижение пирогенной активности. Почти все модификации не влияли на антигенную активность ЛПС трех исследованных штаммов *R. aquatilis* 95U004, 95U011 и 96U035 как в гомологичных, так и в гетерологичных системах. Исключение составляли модифицированный комплексом олова (IV) с никотиноилгидразоном салицилового альдегида ЛПС *R. aquatilis* 95U004, утративший серологическую активность относительно антисыворотки к типовому штамму *R. aquatilis* ATCC 33071, а также модифицированные комплексом германия (IV) с никотиноилгидразоном салицилового альдегида и комплексом олова (IV) с 2-аминобензоилгидразоном салицилового альдегида ЛПС *R. aquatilis* 96U035, которые утратили серологическую активность как с гомологичной, так и с гетерологичными антисыворотками к другим представителям третьей серогруппы.

**Ключевые слова:** липополисахарид, *Rahnella aquatilis*, комплексные соединения германия и олова, токсичность, пирогенность.

# ACTIVITY OF NATIVE AND MODIFIED LIPOPOLYSACCHARIDES OF *Rahnella aquatilis*

L. D. Varbanets<sup>1</sup>  
L. B. Skoklyuk<sup>1</sup>  
V. V. Shubchynskyy<sup>1</sup>  
I. I. Seyfullina<sup>2</sup>  
N. V. Shmatkova<sup>2</sup>  
S. I. Pokhyl<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Institute of Microbiology and Virology  
Zabolotny of National Academy of Sciences  
of Ukraine, Kyiv

<sup>2</sup>I. I. Mechnikov Odessa National University

<sup>3</sup>I. I. Mechnikov Institute of Microbiology  
and Immunology of Academy of Medical  
Sciences of Ukraine, Kharkiv

E-mail: varbanets@serv.imv.kiev.ua

The results of the comparative toxicity studies of native and modified with complex compounds of germanium or tin lipopolysaccharides (LPS) of *Rahnella aquatilis* strains 95U004, 95U011 and 96U035 indicate toxicity decreased of all investigated LPS due to modification of LPS with complexes of germanium (IV) with nicotinoylhydrazon salicylic aldehyde. Interaction of LPS with the tin (IV) complex with nicotinoylhydrazon salicylic aldehyde led to decrease in toxicity only LPS *R. aquatilis* 95U004. In the study of pyrogenic actions of native and modified LPS there was not found out a certain regularity in the action of modifying agents most of which caused a reduction of pyrogenic activity. Almost all the modifications do not affect the neutralizing activity of LPS of the three investigated strains *R. aquatilis* 95U004, 95U011 and 96U035, in homologous and in heterologous systems. Modified complex tin (IV) with nicotinoylhydrazon salicylic aldehyde LPS *R. aquatilis* 95U004 that had lost serological activity toward antiserum to the type strain *R. aquatilis* ATCC 33071 and modified complex of germanium (IV) with nicotinoylhydrazon salicylic aldehyde and complex tin (IV) with 2-aminobenzoylhydrazon salicylic aldehyde LPS *R. aquatilis* 96U035 that had lost their serological activity of both homologous and heterologous systems with antiserum to other representatives of the third serogroup were exceptions.

**Key words:** lipopolysaccharide, *Rahnella aquatilis*, complex compounds of germanium and tin, toxicity, pyrogenicity.