

ЛІПОПОЛІСАХАРИДИ ГРАМНЕГАТИВНИХ БАКТЕРІЙ: СТРУКТУРНІ ОСОБЛИВОСТІ, БІОСИНТЕЗ, ЗАСТОСУВАННЯ В БІОТЕХНОЛОГІЇ

Р. В. ГРИЦАЙ, Л. Д. ВАРБАНЕЦЬ

Інститут мікробіології і вірусології ім. Д. К. Заболотного НАН України, Київ

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

В огляді наведено дані щодо особливостей будови молекули ліпополісахаридів грамнегативних бактерій, яка містить О-специфічний полісахарид, олігосахарид кору і ліпід А, що відрізняються як за складом, так і за ступенем консервативності. Розглянуто шляхи біосинтезу молекули ліпополісахаридів. Показана здатність ліпополісахаридів індукувати утворення низки цитокінів. Описано рецептори, а також протеїни, з якими ліпополісахариди зв'язуються в клітинах макроорганізму. Оскільки ліпополісахариди є головними антигенами грамнегативних бактерій, значну увагу приділено антигенним властивостям як самої молекули ліпополісахариду, так і його структурних компонентів. Обговорюється їх застосування в біотехнології.

Ключові слова: ліпополісахарид, О-специфічний полісахарид, олігосахарид кору, ліпід А, біосинтез, антигенна активність, застосування в біотехнології.

Зовнішній моношар зовнішньої мембрани клітинної стінки грамнегативних бактерій на 2/3 складається з амфифільних глікополімерів — ліпополісахаридів. Ліпополісахариди (ЛПС, ендотоксини) — широко відомі завдяки своїм патофізіологічним, імунологічним і фармакологічним ефектам, що досліджені в системах *in vitro* та *in vivo*. Вони виконують життєво важливі функції, включаючи бар'єрну, захисну, структурну. Існують численні дані про роль ліпополісахаридів як сигнальних молекул під час взаємодії бактерій з організмом хазяїна, однак механізм цих процесів ще остаточно не з'ясовано [1–3].

Загальна структура ЛПС становить розгалужений полісахарид, ковалентно приєднаний до ліпідного компонента (ліпиду А) (рис. 1). Ліпід А вбудований у зовнішню бактеріальну мембрану, тоді як високоваріабельний вуглеводний ланцюг виступає в позаклітинне середовище. Ліпід А утворений із 4–8 жирнокислотних залишків, які з'єднані ефірними та амідними зв'язками з невідновними групами диглюкозаміну. Цей компонент ЛПС відповідальний за ендотоксичні та пірогенні властивості [4].

У вуглеводній частині вирізняють варіабельну частину — О-специфічний полісахарид (ОПС) та консервативну ділянку — олігосахарид кору (ОГ-кору). ОГ-кору містить близько 10 моносахаридів і приєднується до гліукозаміну ліпиду А за допомогою молекули 2-кето-3-дезоксіоктонової кислоти (КДО) — унікального для ендотоксинів бактерій моносахариду. Ліпід А і ОГ-кору утворюють так званий R-тип ЛПС, характерний для деяких мутантних форм і непритаманний більшості диких штамів. Такі бактерії характеризуються підвищеною чутливістю до низки антимікробних речовин і зниженою

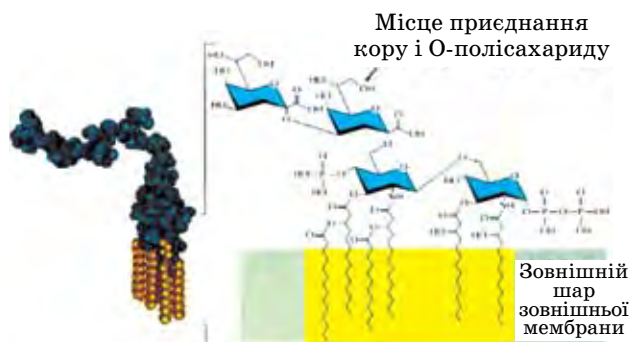


Рис. 1. Будова молекули ліпополісахариду

або втраченою вірулентністю [5]. Винятком є бактерії родів *Neisseria*, *Bordetella*, *Haemophilus* та *Chlamydia*, ЛПС яких у нормі позбавлені О-специфічного полісахариду, за що їм дістали назву «ліпоолігосахариди» [6]. ОПС — найбільш мінлива складова ендотоксину, будова якого визначається штамовою належністю й може модулюватися зовнішніми факторами. О-ланцюг звичайно утворюють від 20 до 40 мономерних одиниць, які можуть містити до 10 різних моносахаридів і утворювати лінійні або розгалужені структури [7]. Завдяки розташуванню та складній будові ОПС виконує роль одного з основних антигенів грамнегативних бактерій. На формування епітопної структури справляють вплив окрім якісного складу також типи зв'язків між мономерами, що уможливорює існування широкого спектра індивідуальних антигенних варіантів. Так, наприклад, існує понад 200 О-ланцюгових варіантів (серотипів) у сальмонелі і 100 — у *Escherichia coli*. Сформована таким чином імунна відповідь проти одного серотипу може бути недієвою відносно всіх інших [8, 9].

Біосинтез ЛПС

Із накопиченням кількості секвенованих послідовностей геному бактерій стає відомим дедалі більше генетичних локусів протеїнів, що беруть участь у біосинтезі ЛПС. Незважаючи на велику кількість отриманої на сьогодні інформації, повний механізм цього багатостадійного процесу ще не розкрито. Найповніше вивченим є біосинтез ЛПС *E. coli* K-12 та *Salmonella enterica*, гомологи частини генів з яких виявлено й у більшості інших видів, що свідчить про існування спільних механізмів, принаймні на певних етапах [10, 11].

Умовний поділ молекули ЛПС на ліпід А, олісахарид кору та ОПС також позначається на генетичній організації їх синтезу. Для ентеробактерій більшість генів, залучених у синтез ОПС, згруповано у високополіморфному кластері *wba* (стара назва *rfb*), де кодуються специфічні нуклеотидсинтази, глікозилтрансферази та ензими трансмембранного перенесення утворених полімерів. Гени, відповідальні за формування внутрішнього та зовнішнього кору ЛПС, утворюють локус *waa* (*rfa*). [12].

Синтез ліпиду А розпочинається з реакції ацилювання, що каталізується протеїном *LpxA*. При цьому відбувається перенесення 3-гідроксиміристинової кислоти (для *E. coli*) із протеїну переносника *ACP* (acyl carrier

protein) до уридиндифосфатглюкозаміну з приєднанням її в третьому положенні. Приєднання другого ацильного залишку здійснюється за допомогою УДФ-3-О-моноацил-N-ацилтрансферази (*lpxD*). Після відщеплення УМФ відбувається реакція конденсації з утворенням тетраацильованого β -1,6-зв'язаного диглюкозамінмонофосфату (гени *lpxH*, *lpxV* відповідно). Закінчується цей етап утворенням так званого ліпиду IV_A, що відрізняється від свого попередника за метаболічним ланцюгом наявністю двох залишків фосфорної кислоти [13].

Наступний етап синтезу ЛПС для бактерій кишкової групи — зв'язування молекул КДО, тимчасом як, наприклад, для *Pseudomonas aeruginosa* ця реакція можлива тільки після повного ацилювання ліпиду А [14]. Приєднання молекул КДО у формі нуклеотидпохідного (активованій) до ліпиду А каталізується КДО-трансферазою *WaaA*. [15]. Для *E. coli* ацилювання ліпиду А завершується додаванням ще двох жирнокислотних залишків. Так звані пізні ацилтрансферази *LpxL* (*WaaM*) і *LpxM* (*WaN*) транспортують лаурат та міристат відповідно до дистального кінця ліпиду А, утворюючи ацилоксиацильні замісники [16].

Першим ензимом, що забезпечує приєднання гептози у формі аденозиндифосфату до Ре-ЛПС є *WaaC*, приєднання наступного залишка каталізується протеїном *WaaF*, третього — *WaaQ*. Усі три протеїни характеризуються високим ступенем гомології [17].

Фосфорилування внутрішнього кору ЛПС разом з аніонними групами КДО забезпечує негативний заряд молекул. Приєднання залишків фосфорної кислоти здійснюється кіназами *WaaP* та *WaaY* в четвертому положенні гептоз. Аніонні групи КДО та залишки фосфатних груп гептоз сприяють зв'язуванню сусідніх молекул ЛПС між собою через іони двовалентних металів. Брак фосфорилування ОГ-кору спричинює підвищення чутливості бактерій R-фенотипів до деяких антибіотиків, зміну протеїнового та фосfolіпідного складу зовнішньої мембрани [18].

Синтез ОПС розпочинається в цитоплазмі з нуклеотидних попередників моносахаридів за допомогою ензимів — глікозилтрансфераз, а закінчується приєднанням до ОГ-кор-ліпиду А в периплазматичному просторі. Послідовне приєднання мономерів до ростучого ланцюга відбувається на мембранно-зв'язаному переноснику ундекапренілфосфаті (*und-P*), який є C₅₅-ізопреноїдним спиртом. На першому етапі формування

ОПС відбувається приєднання моносахаридфосфату до und-P [19]. Полімеризація О-полісахариду — складний, різноманітний та недостатньо вивчений на біохімічному рівні процес.

Залежно від способу перенесення через цитоплазматичну мембрану виділяють три шляхи синтезу ОПС — Wzy-залежний, за допомогою АВС-переносника (ATP-binding cassette transporter) і синтазний, обмежено поширений.

За Wzy-залежного механізму полімеризація ОПС відбувається в периплазматичному просторі. Для цього und-PP-мономер переноситься через цитоплазматичну мембрану фліпазою Wzx. Подовження ОПС здійснюється шляхом перенесення ростучого О-ланцюга із und-PP-переносника і приєднання до невідомого кінця und-PP, зв'язаної одиниці. Полімеризація каталізується О-полісахаридполімеразою Wzy. ЛПС мутантів за відповідним геном складаються із ОГ-кор-ліпиду А, заміщених однією одиницею ОПС (SR-ЛПС). Серед усіх штамів з Wzy-залежним шляхом синтезу ЛПС, вивчених до сьогодні, усі ОПС їх є гетерополісахаридами, переважно з розгалуженими ланцюгами [8, 19].

Синтез за допомогою АВС-переносника характерний для ЛПС із лінійними О-антигенами і передбачає одноетапне подовження ланцюга. Приєднання глікозильних залишків до невідомих кінців und-PP ростучого О-полісахариду відбувається на внутрішній стороні цитоплазматичної мембрани. Після завершення росту und-PP-полісахарид транспортується в периплазматичний простір за допомогою АВС-переносника, де можлива його додаткова модифікація [20].

Механізм, який забезпечує перенесення новосинтезованих молекул ЛПС через зовнішню плазматичну мембрану і локалізацію їх на поверхні клітини, ще не з'ясовано. На прикладі *Salmonella* встановлено, що він функціонує з однаковою ефективністю, незалежно від довжини О-полісахариду [21]. Можлива співучасть у виконанні цієї функції декількох механізмів. Так, протеїн TolA *E. coli*, який бере участь в імпорті бактеріоцинів та бактеріофагів через цитоплазматичну мембрану, забезпечує також транспорт S-ЛПС. Мутанти *E. coli* K-12 tolA є життєздатними, проте у разі штамів дикого типу з гладкими ЛПС ця мутація є летальною [22].

Вплив температури на синтез ЛПС

Зміна температури середовища передусім впливає на агрегатний стан гідрофобної частини клітинних мембран, для збереження нормального функціонування яких у бактерій існують адаптивні механізми, що модифікують жирнокислотний склад ліпідного бішару. Одні з ключових компонентів зовнішньої мембрани грамнегативних мікроорганізмів — ліпополісахариди теж беруть участь у цих процесах, насамперед це стосується структури ліпиду А.

Для представників родини ентеробактерій спільним є поява пальмітолеїнової кислоти під час вирощування за низьких температур. Для сальмонел вона заміщує додеканову кислоту, приєднуючись до гідроксигрупи амідозв'язаної 3-ОН-С_{14:0} [23]. Як було показано пізніше, цей процес здійснюється пальмітолеїлтрансферазою lpxP [24], відповідний ген якої активується при температурі +12 °C і нижче [25]. Мутант *E. coli* з дефектним lpxP-геном при +12 °C мав підвищену чутливість до ванкоміцину, причиною чого, ймовірно, було зниження еластичності зовнішньої мембрани і, як результат, порушення бар'єрної функції [26, 27].

Наступною поширеною температурною модифікацією ліпиду А є зміна вмісту гідроксіацильних замісників. Для мезофільних бактерій зниження температури супроводжується зростанням частки жирних кислот зі спиртовою групою у вуглеводневому скелеті біля другого або третього атома вуглецю [28]. Це супроводжується зменшенням частки додеканової і гексадеканової кислот. Поява ОН-груп в ліпідному шарі очевидно виконує функцію, подібну до розгалужень жирнокислотних ланцюгів фосфоліпідів, зменшуючи густину системи загалом [29]. Цей тип адаптації відіграє ключову роль для екстремально психрофільних мікроорганізмів з дещо інших причин. Культивування психротропного штаму *Pseudomonas syringae* арктичного походження при 4 °C супроводжувалося збільшенням гідроксильованих жирнокислотних замісників у ліпіді А на 32% порівняно з бактеріями, вирощеними за 22 °C. Це пояснюється ослабленням гідрофобного типу взаємодії при температурах, близьких до нуля, і зростанням ролі водневих зв'язків між гідроксіацильними ланцюгами у підтриманні неперервності ліпідного шару [30].

Разом з тим зазначені механізми не мають характеру абсолютної закономірності, що розкриває складність та специфічність процесів формування ЛПС для кожного

виду мікроорганізмів. Наприклад, для ЛПС *Aeromonas hydrophila* за крайніх значень температурного оптимуму (20 °C і 37 °C) спостерігався зворотний ефект — збільшення частки 2-гідроксіацильних замісників з підвищенням температури вирощування [28].

Зміна температури вирощування може впливати також на кількість жирних кислот на одну молекулу ЛПС. Для *Yersinia pestis* з використанням мас-спектроскопії було показано, що при 27 °C виявлено три-, тетра-, пента- і гексаацильні типи ліпиду А, серед яких переважав ліпід А з чотирма жирнокислотними залишками. При 37 °C пул ЛПС містив переважно три- і тетраацильовані молекули і не мав гексаацильних. Також для цього організму характерним було зростання вмісту 4-аміноарабінози за зниження температури росту [25]. Остання, як вважають, є причиною зміни чутливості деяких грамнегативних бактерій до поліміксину В. Так, штами *Y. pestis*, що їх було отримано культивуванням за 25 °C, виявляли в 30 разів меншу чутливість до поліміксину, ніж вирощені за 36 °C. Сприйнятливості їх до антибіотика корелювала зі здатністю до абсорбції поліміксину їхніми ЛПС і зворотно залежала від вмісту катіонного компонента Ara4N, який приєднаний до ліпиду А через фосфатні групи, та гліцину в корі ЛПС. Ще однією температурно-залежною варіацією в складі ЛПС для цього виду був вміст галактози і D-гептози кору [31].

Природа залежності структури ліпиду А від умов росту зумовлена також особливостями його будови у бактерій, адаптованих до різних середовищ існування. Наприклад, типовий ліпід А ентеробактерій має у своєму складі в положеннях 2, 3, 2', 3' диглюкозаміну 3-гідрокситетрадеканову кислоту (3-ОН-С_{14:0}). Для *Rhodocyclus gelatinosus* і *Sphaerotilus natans*, які є мешканцями водойм, усі чотири положення зайняті залишками 3-гідроксидеканової кислоти. *P. aeruginosa*, який має пристосування до сапрофітного способу існування, теж містить коротші жирнокислотні ланцюги в ліпіді А порівняно з *E. coli*. У *H. pylori*, що мешкає в шлунку теплокровних тварин, ліпід А містить 3-ОН-С_{16:0} і 3-ОН-С_{18:0}. Таким чином, у більшості випадків довжина гідроксіацильних ланцюгів є частиною термоадаптації і зростає з підвищенням оптимуму температури росту. Особливим випадком є представники роду *Rhizobium*, *Brucella*, *Bartonella*, внутрішньоклітинні мікроорганізми, ЛПС яких містить 27-ОН-С_{28:0}, що перетинає обидва листки зовнішньої мембрани [26].

Температура середовища може позначатися на довжині О-специфічного полісахариду та його антигенних властивостях. Для *P. aeruginosa*, який вирощували в діапазоні температур 15–45 °C, у бактерій, культивованих на холоді, частка довгих молекул О-полісахариду була більшою порівняно з отриманими за вищої температури. Водночас зі зниженням температури в межах зазначеного діапазону спостерігалось зменшення вмісту S-форм ЛПС удвічі [29]. В іншій роботі було виявлено видовий антиген під час вирощування штамів *P. aeruginosa* серотипу PAO1 за порогової високої температури. Явище спостерігалось також у разі дії інших стресових факторів, таких як підвищена осмолярність, кисле рН, знижений вміст фосфатів. Клітини, вирощені за оптимальних умов, аглютинувалися тільки специфічною до певного серотипу антисироваткою [32].

Електрофореграма ЛПС *A. hydrophila*, вирощених при 37 °C, мала типовий для R-форм характер розподілу, тоді як за 20 °C ЛПС характеризувався S-формою. Культури, отримані за нижчої температури, після перенесення в середовище, в якому їх вирощували при 37 °C, втрачали здатність утворювати повноцінний О-полісахарид одразу після початку експоненційної фази росту [28, 33].

Al-Hendy [34] показав зменшення експресії *wba* регіону *Y. enterocolitica* з підвищенням температури культивування. Це явище зберігалось і після клонування *wba* кластеру *E. coli*, для якої зміна довжини О-полісахариду від температури росту не характерна. Ці дослідження свідчать про існування температурно-індукованого регуляторного гена, що міститься за межами О-антигенного локусу в геномі *Y. enterocolitica*, тоді як в геномі *E. coli* він відсутній.

Біологічна активність ЛПС

Низький фоновий рівень присутності ЛПС в організмі тварин є постійним і нормальним явищем. Вони продукуються головним чином резидентними бактеріями кишечника і потрапляють у кров через портальну вену. Основні процеси, що відбуваються з ними далі, пов'язані з реакціями імунної системи і включають як гуморальну, так і клітинну відповідь. Значення ендогенних ЛПС, основна маса яких поглинається макрофагами, полягає у підтриманні певного рівня сенсibilізації імунної системи, що сприяє більш ефективному її реагуванню в разі потрапляння чужорідних ендотоксинів як у чистому вигляді, так і в складі

бактерій. Імуностимулюючі властивості непротеїнових компонентів грамнегативних мікроорганізмів було відкрито ще наприкінці XIX ст. рядом дослідників, у результаті ліпополісахариди отримали свою першу тривіальну назву — пірогени [9, 35].

Діючою основою ендотоксичних властивостей ЛПС є ліпід А. Токсичні властивості ліпиду А залежать від кількості ацильних замісників, їх розміщення, довжини і ступеня фосфорилування. Тому дифосфорильований гексаацил ліпиду А є оптимальним для розпізнавання рецепторами імунної системи тварин, а отже має високу ендотоксичну активність. Роль фосфатів, імовірно, полягає лише у створенні негативних зарядів, оскільки хімічна заміна їх на фосфоноксидильні групи не позначалася на біологічній активності [36].

ЛПС, як і більшість інших макромолекулярних компонентів бактерій, можуть розпізнаватися системою комплементу й антитілами, що призводить до опсонізації та лізису клітин. Фагоцитам (моноцитам, макрофагам і поліморфноядерним нейтрофілам — ПМН) притаманна здатність до зв'язування опсонізованих бактеріальних фрагментів за посередництва рецепторів комплементу і Fc-рецепторів або ж вони самі можуть синтезувати рецептори, що розпізнають ЛПС (система вродженого імунітету). Провідна роль тут належить моноклеарним фагоцитам [37, 38].

Розпізнавання ліпополісахаридів макрофагами ініціює каскад фізіологічних перетворень, збільшення чисельності імунних клітин. В активованих таким чином макрофагах відбуваються метаболічні зміни, результатом яких є накопичення та екскреція вільних радикалів, бактерицидних агентів (лізоциму, кислих гідролаз, лактоферину та ін.), а також медіаторів запалення. Ключовим медіатором у цьому процесі є TNF- α (альфа-фактор некрозу пухлин) [35].

Екскреція TNF- α , а також інших медіаторів — інтерлейкінів IL-1, IL-6, IL-8, IL-12, фактора активації тромбоцитів, хемокінів і ейкозаноїдів справляє значний вплив на прилеглі тканини. Спільно з анафілотоксинами C3a і C5a деякі з цих медіаторів впливають на циркулюючі ПМН, активуючи їх. ПМН реагують на ці стимули внутрішньосудинною агрегацією, прикріпленням до ендотелію, діapedезом і виробленням медіаторів запалення. На поверхню їхніх клітин екскретуються CD14, CD11/CD18, а також деякі інші компоненти комплементу і Fc-рецептори, що робить їх спроможними до розпізнавання і фагоцитозу ЛПС, бактеріаль-

них фрагментів і цілих бактеріальних клітин. Як і спеціалізовані фагоцити, ПМН виробляють широкий спектр бактерицидних агентів, таких як лізоцим, ензими, активні форми кисню та вільні радикали. Ці агенти слугують головним чином для лізосомальної елімінації мікроорганізмів, хоча в разі прикріплення ПМН до ендотеліальних клітин останні також можуть пошкоджуватися зазначеними цитотоксичними чинниками [39].

Фактори запалення активують В- і Т-лімфоцити, у відповідь останні виділяють IL-2, γ -інтерферон, гранулоцитмакрофагстимулюючий фактор (GM-CSF). IL-2 і GM-CSF залучені в процес проліферації й активації ПМН і моноклеарних клітин, тимчасом як γ -інтерферон посилює ефект ЛПС на моноклеарні клітини [40].

Альтернативний шлях активації комплементу реалізується в результаті зв'язування полісахаридних компонентів (О-полісахариду, капсули і ЛПС) до фактора комплементу 3 (C3). Класичний шлях активації комплементу можливий після приєднання ліпиду А до C1q, а також за присутності специфічних антитіл (класів IgM, IgG₁, IgG₃) до антигенів бактерій. У всіх трьох випадках відбувається утворення і прикріплення C3b до молекул антигену або поверхні мікробної клітини, що сприяє фагоцитозу їх макрофагами і нейтрофілами, веде до вбудовування C5-C9 (мембрано-атакуючий комплекс) у поверхню клітини і наступного лізису бактерій. Довгі О-полісахаридні ланцюги ЛПС перешкоджають локалізації компонентів комплементу на тій відстані до цитоплазматичної мембрани, за якої можливі опсонізація і лізис клітин. У цьому разі як фактор набутого імунітету можуть функціонувати тільки бактерицидні антитіла, які активують комплемент у безпосередній близькості до тих ділянок бактеріальної поверхні, де його цитотоксичний ефект може реалізуватися [41]. У результаті розщеплення C3 і C5 утворюються анафілотоксини C3a і C5a. Вони спричиняють підвищення судинної проникності, є регуляторами прикріплення відповідних рецепторів на поверхні мембран ендотеліальних клітин і нейтрофілів, сприяють активації фагоцитів [42].

У ході інфекційного процесу паренхімальні клітини печінки стимулюються TNF- α , IL-1 і IL-6 до вироблення протеїнів гострої фази (acute-phase proteins), які містять С-реактивний протеїн, плазмовий амілоїд А і Р, ліпополісахаридзв'язувальний протеїн (LPB), гемопексин, гаптоглобін,

комплемент С3 і С9, α -кислотний глікопротеїн, α 2-макроглобулін та деякі інгібітори протеаз. Їхні функції неоднакові, проте спільною є участь у зменшенні негативного впливу на організм інфекційного процесу [40].

Відомо, що преінкубація ендотоксинів із плазмою крові ослаблює їхні пірогенні властивості, що пояснюють зв'язуванням ЛПС ліпопротеїнами крові, переважно ліпопротеїнами високої щільності (ЛВЩ). При цьому відбувається часткова втрата властивості ліпиду А до зв'язування з клітинними рецепторами тваринного організму і, відповідно, здатності активувати макрофаги й ендотеліальні клітини. Ослаблення ЛПС-індукованої активації залежить головним чином від концентрації ліпопротеїнів у сироватці. За присутності низьких концентрацій ліпопротеїнів *in vivo* імунні клітини активуються швидше, ніж відбувається зв'язування ЛПС. Вважають, що зв'язування ЛПС до ЛВЩ відбувається через посередництво LBP і sCD14 і можливе навіть після прикріплення цих бактеріальних агентів до поверхні клітин імунної системи. Ліпопротеїди дуже високої щільності (ЛДВЩ), як і LBP, беруть участь у перенесенні ЛПС до ЛВЩ, у тому числі й екстракцією їх із клітинної стінки бактерій [35, 43].

Експерименти з внутрішньовенним введенням суспензії клітин *E. coli*, які вирощували на мічених ізотопами джерелах вуглецю, показали, що вже через 5 хв 80% радіоактивності зосереджується в печінці, решту розподілено в легенях, селезінці і крові. Нагромадження міченого мікробного матеріалу гепатоцитами супроводжується його елімінацією, яка була майже повною після 24 год від початку експерименту [44, 45]. Mathison і Ulevitch [46] після ін'єкції через портальну вену 250 мг S-ЛПС *E. coli* O111:B4 спостерігали досить швидко очищення сироватки від ендотоксину ($T_{1/2}$ — 30 хв.). За допомогою електронної мікроскопії було показано максимальну асоціацію таких ЛПС із купферовими клітинами [47]. Отримані дані свідчать на користь участі печінки в детоксикації ЛПС, що підтверджується наявністю їхніх метаболітів у складі жовчі після перитонеального введення в організм.

Метаболічна участь ендотоксинів в організмі залежить від структури їхніх ОПС. Так, захоплення ендотеліальними клітинами печінки ЛПС S-типу з циркуляції в кров'яному руслі відбувається майже виключно через посередництво макрофагів, тоді як для ліпополісахаридів R-типу ця умова є неов'язковою [48].

Одним з імовірних шляхів деградації ЛПС є відщеплення жирнокислотних залишків за участю ензиму ацилоксиацилгідролази [49]. Цей ензим присутній в лізосомах ПМН і макрофагах. Деацильовані ЛПС характеризуються зниженою біологічною активністю, крім того виступають в ролі антагоністів нативних ЛПС. Інший спосіб перетворень ЛПС — вкорочення довжини ОПС, що спостерігається після виходу їхніх молекул з купферових клітин. У печінці також відбувається дефосфорилування ЛПС, що так само, як і деацильування, призводить до ослаблення їхньої біологічної активності [35]. Ключову роль в такому перетворенні ЛПС відіграє лужна фосфатаза; оброблення нею ліпополісахаридів *in vitro* призводило до їх дефосфорилування, тимчасом як блокування цього ензиму *in vivo* спричинювало підвищення чутливості мишей до грамнегативних бактерій [50].

Утім, повний ланцюг перетворення ЛПС в організмі та їхні біологічні властивості на кожній стадії такого перетворення остаточно не з'ясовано.

Бактеріальні ліпополісахариди в організмі тварин можуть розпізнаватись і зв'язуватись не тільки антитілами, але й спеціалізованими протеїнами-рецепторами.

Одним з перших охарактеризованих ЛПС-рецепторів був CD11b/CD18- або CR3-рецептор. Зв'язування еритроцитів барана, вкритих ЛПС, *in vitro* з ПМН відбувається за допомогою цього рецептора [51]. У 1990 р. було відкрито рецепторні властивості CD14-рецептора (відомого раніше як моноцитспецифічний антиген), дещо пізніше — родину мембранних рецепторів TLR (Toll-like receptors), а також підтверджено їхню ключову роль у зв'язуванні бактеріальних ЛПС, ліпотейхоевих і тейхоевих кислот, а також передачі сигналу до клітинних ефекторних молекул [52].

CD14 — багатий на лейцин (17,7% у людини) протеїн, що утворений 356 амінокислотами. Цей рецептор вкриває поверхню моноцитів, макрофагів, ПМН, В-лімфоцитів, паренхімальних клітин печінки. Існує також вільна (або розчинна) форма цього протеїну — sCD14. Обидві форми здатні зв'язувати ЛПС, подальша передача сигналу в клітину відбувається тільки через зв'язування цього комплексу з інтегрованим у мембрану протеїном з родини TLR (головним чином TLR4) [53].

Здатність до зв'язування ЛПС з наступним запуском каскаду внутрішньоклітинних перетворень притаманна також рецептору

CD18, що належить до β -інтегринів — родини рецепторів глікопротеїнової природи, які експресуються на поверхні лейкоцитів. Вважають, що рецептор CD18 використовує такий самий шлях активації, що й CD14, однак спорідненість його до рецептора TLR нижча, а відповідно й кінетика такого процесу повільніша [54]. Було продемонстровано здатність P- і L-селектинів до зв'язування ЛПС. Афіність такого процесу є невисокою, тому ці рецептори відіграють певну роль в імунній відповіді на високі концентрації ендотоксинів [55].

У роботі [50] було показано зв'язування ліпиду А до рецепторів SR-A (scavenger receptor A), яке супроводжувалося відщепленням залишків фосфорної кислоти від диглюкозаміну, але не призводило до активації клітин. SR-A — це тривимірні мембранні глікопротеїни, що експресуються тканинними макрофагами (включно з купферовими клітинами), а також синусоїдними й ендотеліальними клітинами печінки. Частка SR-A у зв'язуванні ЛПС, а також інших бактеріальних фрагментів і цілих клітин печінкою становить близько 35% [56].

Серед групи рецепторів клітин печінки слід відзначити рецептор, специфічний до гептоз ЛПС. Цей протеїн вибірково розпізнає і зв'язується з гептозними залишками внутрішнього кору ЛПС. Припускають, що даний рецептор задіяний у процесі вилучення ЛПС із циркуляції внутрішнім середовищем організму з наступним виділенням його в жовч [36].

У внутрішньому середовищі організму ідентифіковано та охарактеризовано низку ліпополісахаридзв'язувальних протеїнів.

1. *BPI (bactericidal/permeability-increasing protein)*. У 1978 р. Weiss [57] ізолював високоефективний бактерицидний протеїн BPI з ПМН людини. Це лужний протеїн масою 55 кДа, який локалізується в азурофільних гранулах ПМН і меншою мірою — у моноцитах і макрофагах, а також може знаходитись у вільній формі. Він має здатність до високоспецифічного зв'язування грамнегативних бактерій і порушення їхньої життєдіяльності шляхом збільшення проникності зовнішньої мембрани. Зв'язування BPI до грамнегативних бактерій відбувається за посередництва ЛПС (цитотоксичної дії на грампозитивні бактерії протеїн не справляє). Експерименти *in vitro* показали, що чутливість різних видів грамнегативних бактерій до бактерицидного ефекту BPI неоднакова. Штами, які містять тільки R-тип ЛПС, є більш чутливими, ніж

ті, що несуть S-тип. За м'якого протеолізу BPI розщеплюється на C-термінальний домен (30 кДа) і N-термінальний фрагмент (25 кДа). Останній виконує ЛПС-зв'язувальну і бактерицидну функції, причому афіність зв'язування з ЛПС не залежить від їхнього серотипу. Після ін'єкції цього протеїну в кров тварин, яким було попередньо введено ЛПС, спостерігається швидке зниження концентрації ендотоксинів, а також цитокінів септичного шоку. Однак через короткий період піврозпаду BPI в організмі (приблизно 10 хв) такий ефект є нетривалим [58].

2. *CAP18 (18-kDa cationic antimicrobial protein)*. Як і BPI, CAP18 було ізолювано з ПМН. Це — протеїн з молекулярною масою 18 кДа, амінокислотна послідовність якого не має гомології з іншими ЛПС-зв'язувальними протеїнами. CAP18 має здатність зв'язувати ЛПС і виявляє бактерицидні властивості. Вироблення і виділення CAP18 епітеліальними клітинами легень, слизовими оболонками верхніх дихальних шляхів може свідчити про його участь в мукозальному імунітеті [54].

3. *CAP37 (гепаринзв'язувальний протеїн)* — глікопротеїн з молекулярною масою 29–37 кДа, є бактерицидним стосовно грамнегативних і грампозитивних бактерій. Крім того, CAP37 має позитивний хемотаксис до моноцитів, бере участь в опсонізації бактерій, посилює ЛПС-індуковану активацію моноцитів і стимулює активність протеїнази С в ендотеліальних клітинах [59].

4. *Лактоферин* — глікопротеїн з молекулярною масою 80 кДа, який присутній у нейтрофільних гранулах, молоці й слизових секретах. Характеризується здатністю до зв'язування ЛПС і бактериостатичною дією — опосередковано, через зв'язування іонів заліза в хелатні комплекси, і прямо, через дестабілізацію мембран грамнегативних бактерій. Лактоферин є головним ЛПС-нейтралізуючим агентом, що виробляється стимульованими ПМН [60].

5. *Лізоцим*. Ohno і Morrison [61] показали утворення комплексів ЛПС–лізоцим *in vitro*, що супроводжувалося зниженням ензиматичної активності лізоциму та ендотоксичності ліпополісахариду. Існування комплексів можливе завдяки гідрофобній взаємодії між молекулами лізоциму та ацильними залишками ліпиду А. Афіність цього зв'язку, як і зниження біологічної активності ЛПС у такому комплексі практично не залежали від вуглеводного складу ендотоксину.

Сучасні стратегії лікування пацієнтів із септичним синдромом обмежуються здебільшого

пригніченням бактеріальної інфекції антибіотиками і заходами інтенсивної терапії. Антибіотикотерапія, однак, не здатна запобігти виходу ЛПС у кровотік і часто, навпаки, сприяє цьому процесові, ще більше посилюючи токсичний ефект. Спроби, що базувалися на видаленні медіаторів сепсису з кровотоку гемоабсорбцією та введення антагоністів цитокінів, таких як $\text{TNF-}\alpha$ і IL-1 , мали позитивний вплив, але показали свою непридатність для клінічного впровадження [62]. Дещо перспективнішими виглядають методи, спрямовані на зв'язування й інактивацію ендотоксинів у внутрішньому середовищі організму, за допомогою ЛПС-зв'язувальних молекул (ВРІ, поліміксину В, антитіл). У досліджах на моделях *in vitro* та *in vivo* у більшості випадків спостерігався позитивний ефект. Однак дослідження в цьому напрямі поки що не створили підґрунтя для широкого практичного використання отриманих результатів. Причиною цього є індивідуальні відмінності серед пацієнтів та складність імунологічних процесів у разі септичного синдрому. Створення нових стратегій лікування пов'язано з поглибленням розуміння механізмів ендотоксичної активності та структурно-функціональної залежності, що її зумовлює [63].

Антигенні властивості ЛПС

Молекули ЛПС грамнегативних бактерій несуть на собі основне антигенне навантаження цих мікроорганізмів, що пов'язано з низкою особливостей. Розташування ЛПС на зовнішній мембрані клітин зумовлює їхню просторову доступність для антитіл, тобто відбувається тривала еволюція імунної системи тварин на розпізнавання і знешкодження патогенних мікроорганізмів шляхом ідентифікації їхніх ЛПС. Функція ключових антигенів бактерій пов'язана також з особливостями будови цих макромолекул. Широка варіабельність складу і просторової структури ЛПС у межах одного виду дозволяє патогенним організмам одних штамів «унікати» набутого імунітету до інших штамів. Така гетерогенність у будові ЛПС може бути використана як критерій в систематиці мікроорганізмів і поділі штамів на серогрупи [64].

Ендотоксини за наявності низки характерних ефектів на імунну систему теплокровних можна віднести до особливої групи імуногенів. З одного боку, на відміну від антигенів протеїнової природи, вони не здатні до взаємодії з молекулами головного комп-

лексу гістосумісності (МНС) і активації Т-лімфоцитів, а з іншого — самі здатні стимулювати В-лімфоцити до проліферації і не потребують участі Т-хелперів [65].

Порівняння будови молекул ЛПС різних штамів і видів грамнегативних мікроорганізмів виявляє найбільшу спорідненість у ОГ-корі (більш консервативному порівняно з ОПС компонентом ЛПС), а також у ліпіді А. Однак виявлення спільних для даної групи бактерій епітопів у складі вищезазначених структур за допомогою імунохімічних реакцій не є достатнім для отримання повних і достовірних результатів, оскільки антигенна гетерогенність молекули ЛПС є функцією не тільки просторової послідовності мономерних ланок. На вибірковість взаємодії паратопів антитіл з ділянками полісахаридного скелета впливають й інші чинники (ефект екранування, неоднакова спорідненість хімічних замісників у молекулах до центру зв'язування антитіла тощо), які істотно позначаються на результатах імунологічних досліджень і водночас є недостатньо вивченими.

Антигенні властивості ліпіді А

Склад ліпіді А залишався консервативним упродовж еволюції мікроорганізмів і є унітарним для більшості родів і родин грамнегативних бактерій. Різноманіття в будові ліпіді А визначається якісним і кількісним жирнокислотним складом і зумовлено пристосуванням виду до способу існування. Така варіація спричинює зміну ендотоксичної дії ліпіді А, його фізико-хімічних властивостей. Однак від структури гідрофобної частини молекули антигенні властивості ліпіді А майже не залежать, тому антитіла до нього здатні до гетерологічних реакцій з цим видом антигенів від низки грамнегативних мікроорганізмів [66].

Імунізація тварин ізольованими ліпополісахаридами S- та R-форм, як і цілими клітинами *E. coli*, не призводила до утворення антиліпід-А-антитіл, головним чином внаслідок ефекту екранування епітопів ліпіді А довгими вуглеводними ланцюгами [67]. Уведення розчину вільного ліпіді А тваринам взагалі не викликало підвищення рівня антитіл [68]. Однією з причин цього є ензиматична деградація ліпіді А (деацільовання і дефосфорилювання), взаємодія зі специфічними клітинними рецепторами і ЛПС-зв'язувальними протеїнами та інші перетворення, яким, зазвичай, піддаються ендотоксини після потрапляння у внутрішнє середовище організму [35].

За допомогою імунохімічних аналізів *in vitro* було продемонстровано різницю в здатності до зв'язування з антитілами вільного й інтегрованого у ліпідну мембрану ліпиду А. Ці дані узгоджуються з неспроможністю нативного ліпиду А спричинювати зростання титру специфічних антитіл під час імунізації у водному розчині, преципітованих на частках суспензії хлориду кальцію, кон'югованих з альбуміном або абсорбованих на полістирольних носіях. Водночас цей антиген, локалізований на поверхні еритроцитів чи включений до складу ліпосом, виявляв таку здатність [69].

З використанням штучних структур було продемонстровано можливість існування принаймні трьох антигенних детермінант за допомогою поліклональної сироватки [70] і п'яти — із застосуванням моноклональних антитіл [66]. За хімічною будовою ці структури відрізняються кількістю фосфорних залишків, що підтверджує роль ступеня фосфорилювання у вияві антигенних властивостей олігосахаридів. Ізольований ліпід А є неоантигеном, епітопи якого містять вільну гідроксигрупу в положенні 6' диглюкозаміну, яка відсутня у складі нативних ендотоксинів, оскільки є частиною глікозидного зв'язку молекули КДО. Саме тому антиліпід-А-антитіла не взаємодіють із R- та S-типами ЛПС [71].

Епітопна структура ОГ-кору та ОПС

У вуглеводній частині ЛПС прийнято виділяти ОГ-кору та ОПС. ОГ-кору в свою чергу поділяється на різні за довжиною ланцюги, що відповідає поділу R-типу ЛПС на субкласи. Ділянку ЛПС, що складається тільки з ліпиду А і приєднаних через молекулу глюкозаміну трьох залишків КДО, відносять до Re-типу. Молекули КДО разом із приєднаною до них трисахаридною ланкою із гептоз (які також можуть нести фосфорні та інші замісники) утворюють так званий внутрішній кор, а відповідні ЛПС класифікують як Rd-тип. До Rc-типу належать ЛПС, олігосахаридний ланцюг яких окрім внутрішнього кору містить два залишки гексоз. Приєднання до них ще двох залишків гексоз і глюкозаміну сприяє завершенню формування зовнішнього кору, а отримана структура має назву Ra-ЛПС (рис. 2). Додаткові моносахариди і їх послідовності прийнято вважати компонентами ОПС [46].

Для ентеробактерій з використанням моноклональних антитіл до Re-ЛПС вдалось ідентифікувати два комплексних епітопи, один з яких обмежується тетрасахаридом

GlcN2-КДО₂, другий включає додатково третій залишок КДО і потребує присутності залишків фосфорної кислоти біля диглюкозаміну. Серед отриманих були також моноклональні антитіла до термінального моносахариду α -КДО (IgM-класу) і дисахариду α -КДО-(2-4)- α -КДО. Усі чотири типи антитіл утворювались також у результаті імунізації кролів прогрітими культурами Re-мутантів ентеробактерій. В отриманій поліклональній антисироватці переважали антитіла до комплексних епітопів, тоді як антитіла до КДО-регіону містились у мінорній кількості. Вищезазначені комплексні епітопи в цьому досліді не виявляли в Rd-Ra ЛПС [72].

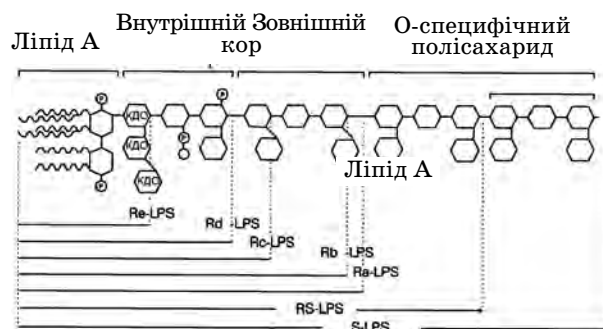


Рис. 2. Схематична структура молекули ЛПС різних R-серотипів

Серед моноклональних антитіл до типових для роду *Chlamydia* Re-ЛПС, що відрізняються від ентеробактеріальних положенням термінального залишку КДО, були як такі, що давали перехресні реакції між двома типами ОГ-кору, так і родоспецифічні. Антигенними детермінантами останніх були трисахарид α -КДО-(2-8)- α -КДО-(2-4)- α -КДО та термінальний КДО-дисахарид [73]. Варто відзначити, що афінність антитіл до епітопів, які містять 2-кето-3-дезоксиктонову кислоту, є вищою порівняно з антитілами до нейтральних моносахаридів [74].

Вивчаючи антигенні властивості ОГ-кору на прикладі Rd₂-типу ЛПС *Salmonella minnesota* з використанням нативних і модифікованих ЛПС та синтетичних олігосахаридів — аналогів окремих ділянок ендотоксину, отримали такі дані [75]. Абсорбція сироватки дефосфорильованими ЛПС або олігосахаридними аналогами окремих фрагментів ОГ-кору не призводила до повного видалення антитіл до нативних або деацильованих ЛПС, а тільки до незначного зменшення титру, що свідчить про існування певної частки (комплексних) антитіл, які потребують присутності фосфорних залишків біля моносахаридів внутрішнього кору.

Присутність глюкозаміну в синтетичних олігосахаридах була не обов'язковою для зв'язування їх з фосфорно-незалежними антитілами в твердофазному імуноензимному аналізі. У свою чергу антигени складу гептоза-КДО і гептоза-КДО-2, кон'юговані з альбуміном, показали селективність у зв'язуванні з антитілами залежно від типу аномерної структури термінального залишку. У варіанті, де КДО перебувала в α -конфігурації, антисироватка демонструвала значно більший титр з відповідним олігосахаридом у порівнянні з олігосахаридом, де КДО знаходилась у β -конфігурації — нетиповій для природних ліпополісахаридів.

Найменшою структурою, яка мала антигенні властивості в тесті пасивної гемаглютинації, була гептоза-КДО-диглюкозамін; присутність гептози була обов'язковою у випадку всіх олігосахаридів для зв'язування з антитілами. Антитіл до гептози та КДО у формі моносахаридів, ізольованого ліпиду А в дослідній антисироватці не виявлено [75].

Імунізація ЛПС Rb-типу, мутантної форми *Neisseria meningitidis* 44/76^{Mu-4} призводила до утворення групспецифічних антитіл, основною складовою епітопів яких був термінальний залишок глюкози. Крім того, титр в імунохімічній реакції значною мірою зумовлений присутністю негативно заряджених груп фосфетаноламіну у складі внутрішнього кору. Позитивна реакція отриманої антисироватки з бактеріями дикого штаму пояснювалась одночасною експресією на поверхні клітин як Ra-ЛПС, так і ліпополісахаридів із незавершеною конфігурацією ОГ-кору [76].

Антигенні властивості внутрішнього кору ЛПС можуть модулюватися фосфорними залишками і моносахаридними замісниками зовнішнього кору, які, однак, не є активною частиною епітопу. Це явище було продемонстровано на прикладі штаму *Klebsiella pneumoniae* R20. Моноклональні антитіла до внутрішнього кору його ЛПС однаково зв'язували як дефосфорильовані, так і позбавлені зовнішнього кору антигени, однак були неактивними стосовно ЛПС, дефектних одночасно за двома цими параметрами [77].

Оскільки за структурою ОПС набагато різноманітніший у межах одного виду, порівняно із варіабельністю ОГ-кору, саме епітопи останнього є найвірогіднішими кандидатами для отримання ЛПС-антитіл вузького кола специфічності. У випадку бактерій з S-формою ЛПС часто має місце екранування корових моносахаридів; цей ефект тим імовірніший, чим ближче розташований конкретний епітоп до ліпиду А. Вивчення цього

явища на прикладі бактерій роду *Salmonella* показало, що поліклональні антитіла до бактеріальних клітин із Re і Rd ЛПС вступали в імунохімічну реакцію виключно з гомологічними антигенами і не мали здатності розпізнавати їх у складі молекул з довшим полісахаридним ланцюгом. У цьому самому досліді Rc- і Rb-антитіла частково взаємодіяли з RS-ліпополісахаридами (за даними імуноблотингу), і тільки антитіла до молекул з повноцінними ОГ-корів мали здатність зв'язуватись із S-хемотипом ЛПС [78]. Серед моноклональних антитіл клони до термінальних залишків КДО *S. minnesota* вступали в імунохімічну реакцію з усіма типами кору даного виду бактерій [72].

З іншого боку, поліклональні антисироватки до шести хемотипів Ra-ЛПС ентеробактерій містили антитіла тільки до зовнішнього кору і не взаємодіяли із Re-Rd типами ЛПС, а також ліпідом А [79].

Мономерні одиниці О-полісахариду містять від одного до десяти глікозильних залишків, будова яких характеризується великим різноманіттям. Відмінності стосуються якісного складу, послідовності моносахаридів, типів хімічного зв'язку між ними, довжини і розгалуженості вуглеводного ланцюга тощо. Це зумовлює існування значної кількості різновидів (серотипів) S-ЛПС для кожного окремого виду грамнегативних бактерій. Окрім того, кількість субодиниць, яка є необхідною для завершення повноцінної структури гладкого типу ліпополісахаридів, коливається від 0 до 50, і окремий організм може утворювати одночасно широкий діапазон різних за довжиною молекул. Ця особливість зумовлює існування класичного переривчастого профілю на електрофореграмах у системі ПААГ-ДСН. Антигенні властивості ОПС характеризуються неоднозначною і важкопрогнозованою залежністю від його будови через значну варіабельність останньої. Тому виділити певні загальні закономірності в цьому разі складно.

Слід зазначити, що молекули ЛПС завдяки амфіфільній природі у водних середовищах утворюють комплекси міцелярного типу, конфігурація яких є визначальною для вироблення антитіл проти цих антигенів.

Фізико-хімічні властивості ЛПС

Ендотоксини є амфіфільними мембранними молекулами з особливими властивостями, будова яких визначає їхню біологічну активність. Форма молекул ЛПС на електронних мікрофотографіях залежить від їх-

ньої хімічної будови, зокрема від різної довжини вуглеводних ланцюгів. Імовірно в основі такої залежності лежать іонні взаємодії між різними частинами молекули [69].

Ліпополісахариди та ліпід А вище критичної міцелярної концентрації у водних розчинах утворюють тривимірні агрегати, структура яких визначається хімічним складом компонентів. Основною фізико-хімічною характеристикою міцел є фазовий стан, зумовлений природою ацильних залишків ліпиду А. Для амфифільних сполук, якими є ендотоксини, характерним є перебування у високовпорядкованій формі гелю (β -фаза) або менш впорядкованій рідкокристалічній α -фазі, перехід між якими відбувається за ліпідспецифічної температури переходу (T_c). Цей фазовий перехід позначається також на структурі їхніх агрегатів. Остання залежить, зокрема, від особливостей будови вуглеводного ланцюга ЛПС, концентрації дивалентних катіонів, співвідношення з рідкою фазою, внаслідок чого можливий досить складний супрамолекулярний структурний поліморфізм [36, 80]. Seydel [81] виявив, що вироблення лейкотрієну C4 макрофагами миші після стимуляції ЛПС *S. minnesota* було інтенсивнішим у випадку Re-LPS (низька T_c), найслабшим — для ліпиду А (висока T_c) і зменшувалось зі зростанням довжини полісахаридного ланцюга. Ці та подібні дослідження дають підстави припустити існування зворотної залежності між ендотоксичністю ЛПС та температурою їх фазового переходу.

Для пояснення впливу міцелярної природи препаратів ендотоксинів на їхню біологічну активність існує альтернативний підхід. Залежно від молекулярної будови і умов рідкої фази ліпополісахариди можуть міститись у вигляді ламел або утворювати агрегати кубічної чи гексагональної форми. Зазвичай біологічно малоактивні ЛПС за фізіологічних умов утворюють ламелярні структури, тоді як препарати з вираженою ендотоксичністю характеризуються складнішою просторовою будовою міцел [81, 82] (рис.3).

Усе вищезазначене є справедливим для високоочищених ЛПС у дослідях *in vitro*. У природних умовах молекули ендотоксинів у рідкому середовищі організму можуть існувати одночасно в декількох складних формах, утворювати комплекси з протеїнами крові, зазнавати часткової деградації тощо. Це позначатиметься на їхній активності і тому передбачити ендотоксичний потенціал ЛПС за допомогою аналізу фізико-хімічних особливостей молекул в кожному конкретному випадку неможливо.

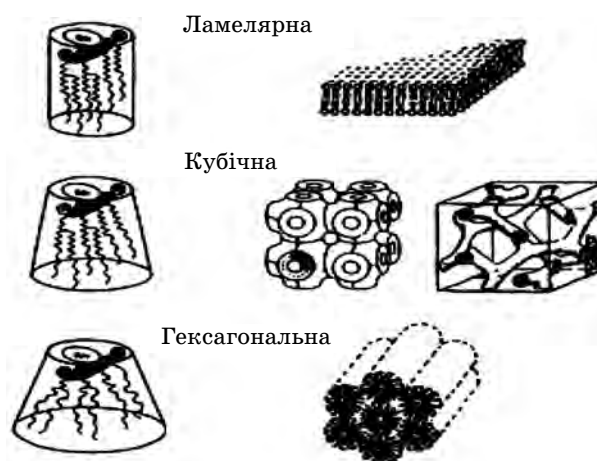


Рис. 3. Форма молекул ЛПС та їхні супрамолекулярні структури

Таким чином, наведено дані щодо особливостей будови молекули ліпополісахаридів грамнегативних бактерій, яка містить О-специфічний полісахарид, олігосахарид кору і ліпід А, що відрізняються як за складом, так і за різним ступенем консервативності. Розглянуто шляхи біосинтезу молекули ліпополісахаридів. Показана здатність ліпополісахаридів індукувати утворення низки цитокінів. Описано рецептори, а також протеїни, з якими ліпополісахариди зв'язуються в клітинах макроорганізму. Оскільки ліпополісахариди є головними антигенами грамнегативних бактерій, значну увагу приділено антигенним властивостям як самої молекули ліпополісахариду, так і його структурних компонентів.

Біотехнологічне використання ЛПС

ЛПС в імунологічних методах діагностики бактеріальних патогенів

Методи діагностики бактеріальних патогенів, які базуються на реакції антиген-антитіло, на сьогодні є досить поширеними і мають низку переваг та можливостей, порівняно з більш сучасними методами. Серед них — простота, коротка тривалість аналізу, дешевизна. Однак у більшості комерційних тест-наборів використовують поліклональні антисироватки, отримані до багатокомпонентного бактеріального антигену, що уможливорює перехресні реакції, даючи змогу уникнути помилкових результатів. У вирішенні цієї проблеми важливим є вибір і використання високоспецифічних антигенів збудника [83, 84]. Одними з кандидатів на цю роль для грамнегативних мікроорганізмів є ЛПС, що характеризуються високою стійкістю до денатурації, простотою виділення та очищення

стосовно традиційних протеїнових антигенів [65].

Імунізація ЛПС пов'язана з низкою практичних обмежень, зумовлених особливостями біологічної активності цих глікополімерів. Молекули ЛПС характеризуються відносно малою молекулярною масою, унаслідок чого мають слабкі імуногенні властивості. Іншим серйозним лімітуючим фактором для стимуляції утворення анти-ЛПС антитіл даним способом є токсичні властивості ліпиду А [36]. Із цієї причини підвищення дози препаратів до кількості, достатньої для продукування задовільного рівня антитіл, у більшості випадків супроводжується серйозними порушеннями життєдіяльності організму. Введення ж окремо полісахаридної частини ЛПС тваринам після видалення ліпиду А не спричинювало підняття рівня ЛПС-специфічних антитіл [85]. Слід відзначити значну зумовленість імуностимулювальних властивостей ЛПС особливостями хімічної структури їхніх молекул, а отже потрібен індивідуальний підхід до отримання антисироваток до різних видів і штамів бактерій [69].

У деяких випадках можлива імунізація нативними ЛПС. Так, наприклад, у разі введення очищених ЛПС *Campylobacter jejuni* в складі ад'юванту Фрейнда було отримано сироватку, титр якої досягав за результатами ІЕА 200 000 для IgG. Зростання рівня IgG спостерігалось вже на 28-й день після першої ін'єкції, IgM — на 18-й день, однак титр останнього не перевищував 800 [86, 87]. Усі тварини добре перенесли імунізацію, що разом з відносно високими дозами введених ЛПС й імуностимулювальними властивостями ад'юванту ймовірно і створило передумови для отримання сироватки з таким високим титром [85].

Одним із простих шляхів усунення токсичних властивостей нативних ЛПС є іммобілізація їх на матриксі, в якому ліпід А був би занурений в ліпофільну фазу і таким чином екранований від впливу на рецептори імунної системи тварин.

Найдавнішим і досить поширеним до сьогодні варіантів такого способу є одержання ЛПС-вмісних антигенів з бактерій після денатурації протеїнових компонентів. Незважаючи на простоту цього методу, в окремих роботах авторам вдалося досягнути значної специфічності антисироваток. Так, Федорова і співавт. [88] розробили метод імуноензимної діагностики на основі сироватки, отриманої до так званих термостабільних

антигенів, яка не давала перехресних реакцій у межах різних серогруп *Vibrio cholerae* (метод було апробовано на більш ніж 70 штаммах та ізолятах цього виду). Однак якісний склад таких антигенних препаратів є досить складним, варіює залежно від виду мікроорганізму і не дає змоги отримати прозоре уявлення про молекулярні механізми, що лежать в основі процесу імунізації, а отже і ґрунтовно інтерпретувати отримані результати. Окрім того, одержані нагріванням бактерій ЛПС-вмісні антигени показали свою непридатність до використання в деяких імунологічних методах досліджень (ІЕА, реакція гемаглютинації) [89].

Можливе також виділення ЛПС у складі частин клітинних стінок бактерій (везикул). Існує кілька методів отримання таких структур, суть яких полягає в порушенні цілісності зовнішньої оболонки бактерій (механічному чи хімічному) і переведенні відділених уламків в розчинну форму з наступним концентруванням одержаного розчину. При імунізації такими препаратами *Neisseria meningitidis* вдалося отримати антисироватку з титром до 1:80 000. За широкого кола варіантів, що їх було охоплено в даній роботі, результати виявилися досить неоднорідними. Сироватки характеризувалися надто гетерогенним за специфічністю набором анти-ЛПС антитіл, що є логічним наслідком багатокомпонентного складу таких антигенів (співвідношення ЛПС:протеїн у середньому становило 1:3) [76].

Вважають, що низька токсичність деяких ЛПС є результатом того, що за нормальних фізіологічних умов вони утворюють міцели щільної ламелярної структури [35]. Для нейтралізації ліпиду А за таким принципом здійснюють їх включення до складу ліпосом, які мають підвищену стабільність порівняно з міцелами ЛПС. Токсичність ЛПС при цьому знижується більш ніж у 100 разів [90].

Додатковим механізмом зниження токсичності ліпиду А є відщеплення залишків фосфорної кислоти і вторинних ацильних груп, які істотно ослаблюють його фізіологічну активність [91].

Метод, що дозволяє усунути дві основні перешкоди на шляху до перетворення ЛПС на ефективний імуноген (низька молекулярна маса і токсичність) полягає в деацильованні ліпополісахаридів і приєднанні їх до молекул-носіїв. Такий спосіб уведення дедалі ширше застосовують у створенні вакцин до патогенних бактерій шляхом ін'єкції їхніх ЛПС у зазначеній формі.

ЛПС у складі компонента вакцин

Бактеріальні інфекції залишаються основною причиною летальних випадків у немовлят та дітей, особливо в країнах, що розвиваються. Вони також відповідальні за появу більшості післяопераційних ускладнень, що супроводжуються септичним синдромом. Ефективність реакції імунної системи, спрямованої на елімінацію вищезазначених збудників, зумовлена головним чином швидкістю утворення антитіл, специфічних до полісахаридів клітинної стінки та капсули бактерій. Набутий імунітет до таких імуногенів дає змогу запобігати виникненню захворювань, створюючи можливість використання вакцин на їх основі. Поряд із вакцинами на основі екстрацелюлярних полісахаридів, що вже впроваджені на практиці, перспективним є залучення ЛПС як одних із основних антигенів грамнегативних бактерій. Для цього полісахаридну частину ЛПС, яка містить специфічні для кола патогенів епітопи, кон'югують з макромолекулою-носієм, в ролі якого зазвичай виступає протеїн [65].

Суть кон'югації полягає в нейтралізації ендотоксичного ефекту ліпиду А та забезпеченні Т-залежного механізму імунної відповіді. Імунна реакція на вільні полі- і олігосахаридні ланцюги є Т-незалежною, гуморальна відповідь передбачає переважно вироблення низькоафінних антитіл класу IgM і значно меншою мірою IgG2, що не здатні до активації комплементу. Ефективна Т-клітинна відповідь супроводжується продукуванням специфічних ізотипів IgM-антитіл, високим вмістом IgG1 і IgA. Стимуляція В-клітин до екскреції IgG імуноглобулінів відбувається через міжклітинну взаємодію з індукованими антигенспецифічними Т-хелперними лімфоцитами [40]. Макромолекула-кон'югат виконує роль медіатора в активації Т-залежної імунної відповіді до вуглеводного епітопу, що локалізований на його поверхні. У свою чергу перебіг імунологічного процесу таким шляхом веде до виникнення у В-клітин тривалої імунологічної пам'яті, а отже створює основу для стрімкого зростання рівня антитіл після реімунізації [92].

Вакцини, що базуються на кон'югатах синтетичних олігосахаридів, характеризуються вищою чистотою та стабільністю складу порівняно з традиційними препаратами. Вони також більш імуногенні, безпечні та ефективні, хоча залишаються високо-вартісною альтернативою. Їх використання дає змогу поєднувати антигенні детермінанти до всіх серотипів збудника, представлених в даному регіоні [84].

Як показали результати численних досліджень, імуногенність цих препаратів залежатиме від таких чинників, як вік реципієнта, імунологічні властивості ЛПС і молекули-носія, мінімальна довжина полісахаридного ланцюга, яка здатна до стимуляції вироблення антитіл, мінімальна густина ПС на одну молекулу носія і конфігурація кон'югату [93].

Використання кон'югатів показало їхню безпечність — ні у тварин, ні в людини вони не викликали небажаної побічної дії, при цьому рівень анти-ЛПС антитіл знаходився приблизно на рівні з таким, що виникає у разі потрапляння живих мікроорганізмів у внутрішнє середовище організму [94].

Відомо, що один штам може утворювати одночасно декілька імунотипів ЛПС, які відрізняються довжиною ОПС [76]. Тому під час імунізації виділеними ЛПС утворюються антитіла до різних частин полісахариду, в тому числі й неспецифічних, що становить перешкоду для створення антисироватки, яка б не давала перехресних реакцій з іншими штамми. Існують також технічні труднощі у використанні кон'югатів нативних ОПС, що не дозволяють отримувати продукт з постійним хімічним складом, а отже й стандартизувати дослідження [95].

Для вирішення цієї проблеми вдаються до штучного синтезу просторової послідовності з моносахаридів, що відповідає потрібній ділянці ОПС. Афінність антитіл, отриманих до кон'югованих з носієм олігосахаридних мономерів, майже в 100 разів вища, ніж в аналогічних за специфічністю антитілах у складі антисироватки до цілих бактеріальних клітин [96].

Окрім того, цей метод дає дослідникові більші можливості впливати на будову і властивості отримуваних препаратів. Так, було показано, що оптимальна кратність полісахаридних послідовностей (довжина ланцюга) варіює в межах від 8 до 12 і дозволяє одержувати антисироватку з титром антитіл у 10 і більше разів вищим, ніж до кон'югатів з нативними ОПС, тимчасом як кон'югати неpolімеризованих олігосахаридів не спричинювали продукування антитіл [97]. Ще одним чинником, що піддається регуляції людиною і впливає на імуногенність кон'югату, є кількість полісахаридних ланцюгів, що припадає на одну молекулу носія. Надто низьке значення цієї величини призводить до послаблення імуногенності через недостатню концентрацію імуногену для вироблення антитіл. З іншого боку, висока концентрація ОПС на поверхні

протеїну екранує його від контакту і стимуляції Т-лімфоцитів, а отже знижує ад'ювантні властивості [98].

Гетерогенність ЛПС як критерій класифікації штамів бактерій

У практиці мікробіологічних досліджень під час роботи з ізолятами бактерій окрім встановлення видової належності постає необхідність їх типізації, яка передбачає ідентифікацію кожного з ізолятів та встановлює міру спорідненості між ними. Це дає змогу розкрити внутрішню структуру виду і покладено в основу створення відповідних систем класифікації. Для комплексних видів, а також більшості патогенних бактерій субвидове положення може надати інформацію про екологічне оточення, біологічні та патогенні властивості, а отже слугувати в підборі умов роботи з ними.

Перші підходи для задоволення потреби в диференціації ізолятів патогенних бактерій базувались на реакції антиген-антитіло, наслідком чого стало створення серотипових систем класифікації, які історично для багатьох видів стали базовими. Для грамнегативних мікроорганізмів серотип звичайно зумовлений антигенними властивостями їхніх ЛПС, тому може бути визначений імунохімічними методами досліджень структури цих молекул. Загальноприйнятим антигенним аналізом грамнегативних бактерій є реакції аглютинації з використанням кролячої антисироватки в порівнянні зі стандартними О-антигенами відповідних штамів, що, враховуючи велику кількість існуючих серогруп, робить його досить трудомістким методом [99]. Так, наприклад, для проведення аналізу ізоляту сальмонел згідно зі схемою, схваленою ВООЗ, необхідно близько трьох днів. При цьому зазвичай 5–8% ізолятів залишаються не ідентифікованими. Причиною цього є вплив низки чинників, серед яких — екранування поверхневих О-полісахаридів капсулярними глікополімерами у випадку мукоїдних штамів, а також спонтанне утворення R-мутантів, неповноцінні ЛПС яких характеризуються нетиповою епітопною структурою. Антигенні властивості ЛПС можуть модулюватися,

зокрема, умовами культивування, що вимагає стандартизації проведення аналізу. Одержання набору антисироваток для визначення серотипу є високовартісним, потребує наявності представників рідкісних серотипів [100] і саме тому виготовлення їх здійснюють усього кілька лабораторій у світі.

Протягом останніх 20 років було запропоновано низку методів серотипізації ізолятів, альтернативних імунохімічним. Перші спроби полягали в пошукові серотипоспецифічних маркерів у фінгерпринтах, отриманих рестрикційним аналізом, методом полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР), електрофоретичного профілювання протеїнів бактерій тощо. Усі вони базувалися на опосередкованих до структури ЛПС ознаках та характеризувалися низькою відтворюваністю результатів, особливо в межах різних лабораторій. Розшифрування бактеріального геному уможливило встановлення фенотипових характеристик аналізом послідовностей ДНК, що їх визначають [101]. Показано, що О-антигенний серотип визначається складом генів, відповідальних за його утворення, а не варіацією їх нуклеотидних послідовностей [102]. Це сприяло появі методів серотипізації, що базуються на ПЛР кластеру генів *uba*, які беруть участь у синтезі О-полісахариду. Серед цільових генів, що залучаються при цьому, можна виділити три групи. Це такі, що кодують ензими синтезу моносахаридів О-полісахариду, глікозилтрансферази, відповідальні за полімеризацію вуглеводного ланцюга, та ензими перенесення синтезованого О-полісахариду в периплазматичний простір.

За цим принципом було створено тест-системи для серотипізації ряду патогенних бактерій — *E. coli* [99, 103], *S. enterica* [100], збудника лептоспірозу [104], *Y. pestis* [101], *Enterobacter sakazakii* [105] та ін. Специфічність цих методів знаходилась у межах 97–100%. Широкому впровадженню їх у біотехнологічну практику має передувати велика робота з перевірки достовірності, надійності та повної відповідності отримуваних результатів класичній схемі серотипізації.

ЛІТЕРАТУРА

1. *Esposito N., Ovchinnikova O., Baronea A. et al.* Host and non-host plant response to bacterial wilt in potato: role of the lipopolysaccharide isolated from *Ralstonia solanacearum* and molecular analysis of plant-pathogen interaction // Chem. Biodivers. — 2008. — V. 5. — P. 2662–2675.
2. *Desender S., Klarzynski O., Potin P. et al.* Lipopolysaccharides of *Pectobacterium atrosepticum* and *Pseudomonas corrugata* induce dif-

- ferent defence response patterns in tobacco, tomato, and potato // *Plant. Biol.* — 2006. — V. 8. — P. 636–645.
3. Newman M., Dow J., Molinaro A., Parrilli M. Priming, induction and modulation of plant defence responses by bacterial lipopolysaccharides // *J. Endotoxin Res.* — 2007. — V. 13. — P. 69–84.
 4. Zhang Y., Gaekwad J., Wolfert M.A., Boons G.J. Modulation of innate immune responses with synthetic lipid A derivatives // *J. Am. Chem. Soc.* — 2007. — V. 129. — P. 5200–5216.
 5. Yokota S., Fujii N. Contributions of the lipopolysaccharide outer core oligosaccharide region on the cell surface properties of *Pseudomonas aeruginosa* // *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* — 2007. — V. 30. — P. 97–109.
 6. Preston A., Mandrell R. E., Gibson B. W., Apicella M. A. The lipooligosaccharides of pathogenic gram-negative bacteria // *Crit. Rev. Microb.* — 1996. — V. 22. — P. 139–180.
 7. Williams K. Endotoxins pyrogens, LAL testing and depyrogenation. — New York: Informa Healthcare, 2007. — 419 p.
 8. Raetz C., Whitfield C. Lipopolysaccharide endotoxins // *Annu. Rev. Biochem.* — 2002. — V. 71. — P. 635–700.
 9. Caroff M., Karibian D. Structure of bacterial lipopolysaccharides // *Carbohydr. Res.* — 2003. — V. 338. — P. 2431–2447.
 10. Gronow S., Brade H. Lipopolysaccharide biosynthesis: which steps do bacteria need to survive? // *J. Endotoxin Res.* — 2001. — V. 7. — P. 3–23.
 11. Preston A., Allen A. G., Cadisch J. et al. Genetic basis for lipopolysaccharide O-antigen biosynthesis in *Bordetellae* // *Infect. Immun.* — 1999. — V. 67. — P. 3763–3767.
 12. Bos M. P., Robert V., Tommassen J. Biogenesis of the gram-negative bacterial outer membrane // *Annu. Rev. Microbiol.* — 2007. — V. 61. — P. 191–214.
 13. Trent M. S. Biosynthesis, transport, and modification of lipid A // *Biochem. Cell Biol.* — 2004. — V. 82. — P. 71–86.
 14. Knirel Y. A., Bystrova O. V., Kocharova N. A. et al. Conserved and variable structural features in the lipopolysaccharide of *Pseudomonas aeruginosa* // *J. Endotoxin Res.* — 2006. — V. 12. — P. 324–336.
 15. Brabetz W., Lindner B., Brade H. Comparative analyses of secondary gene products of 3-deoxy-D-manno-oct-2-ulosonic acid transferases from *Chlamydiaceae* in *Escherichia coli* K-12 // *Eur. J. Biochem.* — 2000. — V. 267. — P. 5458–5465.
 16. Raetz C. R., Reynolds C. M., Trent M. S., Bishop R. E. Lipid A modification systems in gram-negative bacteria // *Annu. Rev. Biochem.* — 2007. — V. 76. — P. 295–329.
 17. Parker C. T., Pradel E., Schnaitman C. A. Identification and sequences of the lipopolysaccharide core biosynthetic genes *rfaQ*, *rfaP*, and *rfaG* of *Escherichia coli* K-12 // *J. Bacteriol.* — 1992. — V. 174 — P. 930–934.
 18. Yethon J. A., Heinrichs D. E., Monteiro M. A. et al. Involvement of *waaY*, *waaQ*, and *waaP* in the modification of *Escherichia coli* lipopolysaccharide and their role in the formation of a stable outer membrane // *J. Biol. Chem.* — 1998. — V. 273. — P. 26310–2636.
 19. Brockhausen I., Hu B., Liu B. et al. Characterization of two beta-1,3-glucosyltransferases from *Escherichia coli* serotypes O56 and O152 // *J. Bacteriol.* — 2008. — V. 190. — P. 4922–4932.
 20. Perepelov A. V., Li D., Liu B. et al. Structural and genetic characterization of *Escherichia coli* O99 antigen // *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* — 2009. — V. 57. — P. 80–87.
 21. Whitfield C., Amor P. A., Koplín R. Modulation of the surface architecture of gram-negative bacteria by the action of surface polymer: lipid A-core ligase and by determinants of polymer chain length // *Mol. Microbiol.* — 1997. — V. 23. — P. 629–638.
 22. Vines E. D., Marolda C. L., Balachandran A., Valvano M. A. Defective O-antigen polymerization in *tolA* and *pal* mutants of *Escherichia coli* in response to extracytoplasmic stress // *J. Bacteriol.* — 2005. — V. 187. — P. 3359–3368.
 23. Carty S. M., Sreekumar K. R., Raetz C. R. Effect of cold shock on lipid A biosynthesis in *Escherichia coli*. Induction At 12 degrees C of an acyltransferase specific for palmitoleoyl-acyl carrier protein // *J. Biol. Chem.* — 1999. — V. 274. — P. 9677–9685.
 24. Burtnick M. N., Woods D. E. Isolation of polymyxin B-susceptible mutants of *Burkholderia pseudomallei* and molecular characterization of genetic loci involved in polymyxin B resistance // *Antimicrob. Agents Chemother.* — 1999. — V. 43. — P. 2648–2656.
 25. Kawahara K., Tsukano H., Watanabe H. Modification of the structure and activity of lipid A in *Yersinia pestis* lipopolysaccharide by growth temperature // *Infect. Immun.* — 2002. — V. 70. — P. 4092–4098.
 26. Nikaido H. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* — 2003. — V. 67. — P. 650–656.
 27. Weiss J., Hutzler M., Kao L. Environmental modulation of lipopolysaccharide chain length alters the sensitivity of *Escherichia coli* to the neutrophil bactericidal/permeability-increasing protein // *Infect. Immun.* — 1986. — V. 51. — P. 594–549.
 28. Kumar G. S., Jagannadham M. V., Ray M. K. Low-temperature-induced changes in composition and fluidity of lipopolysaccharides in

- the antarctic psychrotrophic bacterium *Pseudomonas syringae* // J. Bacteriol. — 2002. — V. 184. — P. 6746–6749.
29. Kropinski A. M., Lewis V., Berry D. Effect of growth temperature on the lipids, outer membrane proteins, and lipopolysaccharides of *Pseudomonas aeruginosa* PAO // Ibid. — 1987. — V. 69. — P. 1960–1966.
30. Wollenweber H. W., Schlecht S., Luderitz O., Rietschel E. T. Fatty acid in lipopolysaccharides of *Salmonella* species grown at low temperature. Identification and position // Eur. J. Biochem. — 1983. — V. 17. — P. 167–171.
31. Anisimov A. P., Dentovskaya S. V., Titareva G. M. et al. Intraspecies and temperature-dependent variations in susceptibility of *Yersinia pestis* to the bactericidal action of serum and to polymyxin B // Infect. Immun. — 2005. — V. 73. — P. 7324–7331.
32. McGroarty E. J., Rivera M. Growth-dependent alterations in production of serotype-specific and common antigen lipopolysaccharides in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 // Ibid. — 1990. — V. 58. — P. 1030–1037.
33. Merino S., Camprubi S., Tomas J. M. Effect of growth temperature on outer membrane components and virulence of *Aeromonas hydrophila* strains of serotype O:34 // Ibid. — 1992. — V. 60. — P. 4343–4349.
34. Al-Hendy A., Toivanen P., Skurnik M. The effect of growth temperature on the biosynthesis of *Yersinia enterocolitica* O:3 lipopolysaccharide: temperature regulates the transcription of the *rfb* but not of the *rfa* region // Microb. Pathog. — 1991. — V. 10. — P. 81–86.
35. Amersfoort E. S., Van Berkel T., Kuiper J. Receptors, mediators, and mechanisms involved in bacterial sepsis and septic shock // Clinical Microbiol. Rev. — 2003. — V. 16. — P. 379–414.
36. Erridge C., Poxton B. J. Structure and function of lipopolysaccharides // Microbes Infect. — 2002. — V. 4. — P. 837–851.
37. Hasunuma R., Morita H., Tanaka S. et al. Differential clearance and induction of host responses by various administered or released lipopolysaccharides // J. Endotoxin Res. — 2001. — V. 7. — P. 421–429.
38. Kirikae T., Nitta T., Kirikae F. et al. Lipopolysaccharides (LPS) of oral black-pigmented bacteria induce tumor necrosis factor production by LPS-refractory C3H/HeJ macrophages in a way different from that of *Salmonella* LPS // Infect. Immun. — 1999. — V. 67. — P. 1736–1742.
39. Fujihara M., Muroi M., Tanamoto K. et al. Molecular mechanisms of macrophage activation and deactivation by lipopolysaccharide: roles of the receptor complex // Pharmacol. Ther. — 2003. — V. 100. — P. 171–194.
40. Пойм А., Мейл Б. Иммунология. — М.: Мир, 2000. — 592 с.
41. Casey L. C. Immunologic response to infection and its role in septic shock // Crit. Care Clin. — 2000. — V. 16. — P. 193–213.
42. Wiese A., Brandenburg K., Ulmer A. et al. The dual role of lipopolysaccharide as effector and target molecule // J. Biol. Chem. — 1999. — V. 380. — P. 767–784.
43. Ulevitch R., Johnston A. The modification of biophysical and endotoxic properties of bacterial lipopolysaccharides by serum // J. Clin. Invest. — 1978. — V. 62. — P. 1313–1324.
44. Klein A., Zhadkewich M., Margolick J. et al. Quantitative discrimination of hepatic reticuloendothelial clearance and phagocytic killing // J. Leukocyte Biology. — 1994. — V. 55. — P. 248–252.
45. Marangoni A., Aldini R., Sambri V. et al. Uptake and killing of *Leptospira interrogans* and *Borrelia burgdorferi*, spirochetes pathogenic to humans, by reticuloendothelial cells in perfused rat liver // Infect. Immun. — 2000 — V. 68. — P. 5408–5411.
46. Mathison J. C., Ulevitch R. The clearance, tissue distribution, and cellular localization of intravenously injected lipopolysaccharide in rabbits // J. Immunol. — 1979. — V. 123. — P. 2133–2143.
47. Van Bossuyt H., De Zanger R., Wisse E. Cellular and subcellular distribution of injected lipopolysaccharide in rat liver and its inactivation by bile salts // J. Hepatol. — 1988. — V. 7. — P. 325–337.
48. Satoh M., Ando S., Shinoda T., Yamazaki M. Clearance of bacterial lipopolysaccharides and lipid A by the liver and the role of argininosuccinate synthase // Innate Immun. — 2008. — V. 14. — P. 51–60.
49. Munford R. S., Varley A. W. Shield as signal: lipopolysaccharides and the evolution of immunity to gram-negative bacteria // PLoS Pathog. — 2006. — V. 6. — P. 467–471.
50. Tuin A., Huizinga-Van der Vlag A., van Loenen-Weemaes A. M. et al. On the role and fate of LPS-dephosphorylating activity in the rat liver // Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol. — 2006. — V. 290. — P. 377–385.
51. Wright S. D., Jong M. Adhesion-promoting receptors on human macrophages recognize *Escherichia coli* by binding to lipopolysaccharide // J. Exp. Med. — 1986. — V. 164. — P. 1876–1888.
52. Perera P. Y., Mayadas T. N., Takeuchi O. et al. CD11b/CD18 acts in concert with CD14 and Toll-like receptor (TLR) 4 to elicit full lipopolysaccharide and taxol-inducible gene expression // J. Immunol. — 2001. — V. 166, N 1. — P. 574–581.
53. Ingalls R., Heine H., Lien E. et al. Lipopolysaccharide recognition, CD14, and lipopoly-

- saccharide receptors // *Infect. Dis. Clin. North Amer.* — 1999. — V. 13, N 2. — P. 341–353.
54. Wong K. F., Luk J. M. Endotoxin-neutralizing peptides as gram-negative sepsis therapeutics // *Protein Pept. Lett.* — 2009. — V. 16. — P. 539–542.
 55. Lee C. W., Bennouna S., Denkers E. Y. Screening for *Toxoplasma gondii*-regulated transcriptional responses in lipopolysaccharide-activated macrophages // *Infect. Immun.* — 2006. — V. 74. — P. 1916–1923.
 56. Platt N., Haworth R., Darley L., Gordon S. The many roles of the class A macrophage scavenger receptor // *Int. Rev. Cytol.* — 2002. — V. 212. — P. 1–40.
 57. Welss J., Elsbach P., Olsson I., Odeberg D. Purification and characterization of a potent bactericidal and membrane active protein from the granules of human polymorphonuclear leukocytes // *J. Biol. Chem.* — 1978. — V. 253. — P. 2664–2672.
 58. Schultz H., Weiss J. P. The bactericidal/permeability-increasing protein (BPI) in infection and inflammatory disease // *Clin. Chim. Acta.* — 2007. — V. 384. — P. 12–23.
 59. Heinzelmann M., Kim E., Hofmeister A. et al. Heparin binding protein differentially modulates endotoxin-induced cytokine production // *Int. J. Surg. Investig.* — 2001. — V. 2. — P. 457–466.
 60. Baveye S., Ellass E., Fernig D. G. et al. Human lactoferrin interacts with soluble CD14 and inhibits expression of endothelial adhesion molecules, E-selectin and ICAM-1, induced by the CD14-lipopolysaccharide complex // *Infect. Immun.* — 2000. — V. 68. — P. 6519–6525.
 61. Ohno N., Morrison D. Lipopolysaccharide interaction with lysozyme // *J. Biol. Chem.* — 1989. — V. 264. — P. 4434–4441.
 62. Baumgartner J.-D. Therapeutic approaches targeting endotoxin-derived mediators / Baumgartner J.-D., Heumann D., Glauser M.-P.; In: Brade H., Opal S. M., Vogel S. N., Morrison D. C. (Eds.) / *Endotoxin in health and disease.* — N.Y.: Marcel Dekker Inc., 1999. — P. 865–876.
 63. Opal S. M. The host response to endotoxin, anti-lipopolysaccharide strategies, and the management of severe sepsis // *Int. J. Med. Microbiol.* — 2007. — V. 297. — P. 365–377.
 64. Kim S., Reuhs B. L., Mauer L. J. Use of Fourier transform infrared spectra of crude bacterial lipopolysaccharides and chemometrics for differentiation of *Salmonella enterica* serotypes // *J. Appl. Microbiol.* — 2005. — V. 99. — P. 411–417.
 65. Weintraub A. Immunology of bacterial polysaccharide antigens // *Carbohydr. Res.* — 2003. — V. 338. — P. 2539–2547.
 66. Kuhn H., Brade L., Appelmeik B. et al. Characterization of the epitope specificity of murine monoclonal antibodies directed against lipid A // *Infect. Immun.* — 1992. — V. 60. — P. 2201–2210.
 67. Mattsby-Baltzer I., Kaijser B. Lipid A and anti-lipid A // *Ibid.* — 1979. — V. 23. — P. 758–763.
 68. Galanos C., Luderitz O., Westphal O. Preparation and properties of antisera against the lipid-A component of bacterial lipopolysaccharides // *Eur. J. Biochem.* — 1971. — V. 24. — P. 116–122.
 69. Brade L., Brandenburg K., Kuhn Kusumoto S. et al. The immunogenicity and antigenicity of lipid A are influenced by its physicochemical state and environment // *Infect Immun.* — 1987. — V. 55. — P. 2636–2644.
 70. Brade L., Rietschel E. T., Kusumoto S. et al. Immunogenicity and antigenicity of synthetic *Escherichia coli* lipid A // *Ibid.* — 1986. — V. 51. — P. 110–114.
 71. Brade L., Engel R., Christ W., Rietschel E. T. A nonsubstituted primary hydroxyl group in position 6' of free lipid A is required for binding of lipid A monoclonal antibodies // *Ibid.* — 1997. — V. 65. — P. 3961–3965.
 72. Rozalski A., Brade L., Kosma P. et al. Epitope specificities of murine monoclonal and rabbit polyclonal antibodies against enterobacterial lipopolysaccharides of the Re chemotype // *Ibid.* — 1989. — V. 57. — P. 2645–2652.
 73. Fu Y., Baumann M., Kosma P. et al. Synthetic glycoconjugate representing the genus-specific epitope of chlamydial lipopolysaccharide exhibits the same specificity as its natural counterpart // *Ibid.* — 1992. — V. 60. — P. 1314–1321.
 74. Muller-Loennies S., MacKenzie C. R., Pate-naude S. I. et al. Characterization of high affinity monoclonal antibodies specific for chlamydial lipopolysaccharide // *Glycobiology.* — 2000. — V. 10. — P. 121–130.
 75. Swierzko A., Brade L., Paulsen H., Brade H. Specificity of rabbit antisera against the rough lipopolysaccharide of *Salmonella minnesota R4* // *Infect. Immun.* — 1993. — V. 61. — P. 3216–3221.
 76. Rune S., Guthrie T., Guile G. Cross-reactive polyclonal antibodies to the inner core of lipopolysaccharide from *Neisseria meningitidis* // *Ibid.* — 2002. — V. 70. — P. 1293–1300.
 77. Susskind M., Brade L., Brade H., Holst O. Chemical and antigenic structure of lipopolysaccharides from *Klebsiella Pneumoniae ssp. Pneumoniae* Rough Strain R20 // *J. Biol. Chem.* — 1998. — V. 273. — P. 7006–7017.
 78. Nnalue N. A. All accessible epitopes in the *Salmonella* lipopolysaccharide core are associated with branch residues // *Infect. Immun.* — 1999. — V. 67. — P. 998–1003.
 79. Nnalue N. A., Khan G., Mustafa N. Cross-reactivity between six *Enterobacteriaceae*

- complete lipopolysaccharide core chemotypes // J. Med. Microbiol. — 1999. — V. 48. — P. 433–441.
80. Parikh S. J., Chorover J. Infrared spectroscopy studies of cation effects on lipopolysaccharides in aqueous solution // Colloids. Surf. B. Biointerfaces. — 2007. — V. 55. — P. 241–250.
81. Seydel U., Mueller M., Lindner B. et al. Aggregates are the biologically active units of endotoxin // J. Biol. Chem. — 2004. — V. 279 — P. 26307–26313.
82. Schromm A. B., Brandenburg K., Loppnow H. et al. Biological activities of lipopolysaccharides are determined by the shape of their lipid A portion // Eur. J. Biochem. — 2000. — V. 267. — P. 2008–2013.
83. Rodriguez A., Rello J., Neira J. et al. Effects of high-dose of intravenous immunoglobulin and antibiotics on survival for severe sepsis undergoing surgery // Shock. — 2005. — V. 23. — P. 298–304.
84. Van Oss C. J. Immunological and molecular diagnosis of infectious disease. — N.Y.: CRC, 1997. — 295 p.
85. Boutonnier A., Villeneuve S., Nato F. et al. Preparation, immunogenicity, and protective efficacy, in a murine model, of a conjugate vaccine composed of the polysaccharide moiety of the lipopolysaccharide of *Vibrio cholerae* O139 bound to tetanus toxoid // Infect. Immun. — 2001. — V. 69. — P. 3488–3493.
86. Ang C. W., Laman J. D., Willison H. J. et al. Structure of *Campylobacter jejuni* lipopolysaccharides determines antiganglioside specificity and clinical features of Guillain-Barre and Miller Fisher patients // Ibid. — 2002. — V. 70. — P. 1202–1208.
87. Ang C. W., De Klerk M. A., Endtz H. P. et al. Guillain-Barre syndrome- and Miller Fisher syndrome-associated *Campylobacter jejuni* lipopolysaccharides induce anti-GM1 and anti-GQ1b Antibodies in rabbits // Ibid. — 2001. — V. 69. — P. 2462–2469.
88. Feodorova V. A., Gromova O. V., Devdariani Z. L. et al. Immunochemical characterization of *Vibrio cholerae* O139 O antigens and production of a diagnostic antiserum without absorbtion // J. Med. Microbil. — 2001. — V. 50. — P. 499–508.
89. Mills S. D., Kurjanczyk L. A., Penner J. L. Antigenicity of *Helicobacter pylori* lipopolysaccharides // J. Clin. Microbiol. — 1992. — V. 30. — P. 3175–3180.
90. Bennett-Guerrero E., McIntosh T. J., Barclay G. R. et al. Preparation and preclinical evaluation of a novel liposomal complete-core lipopolysaccharide vaccine // Infect. Immun. — 2000. — V. 68. — P. 6202–6208.
91. Casella C. R., Mitchell T. C. Putting endotoxin to work for us: monophosphoryl lipid A as a safe and effective vaccine adjuvant // Cell. Mol. Life Sci. — 2008. — V. 65. — P. 3231–3240.
92. Paulovicova E., Machova E., Hostacka A., Bystriky S. Immunological properties of complex conjugates based on *Vibrio cholerae* O1 Ogawa lipopolysaccharide antigen // Clin. Exp. Immunol. — 2006. — V. 144. — P. 521–527.
93. Pozsgay V., Chu C., Pannell L. et al. Protein conjugates of synthetic saccharides elicit higher levels of serum IgG lipopolysaccharide antibodies in mice than do those of the O-specific polysaccharide from *Shigella dysenteriae* type 1 // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 1999. — V. 96. — P. 5194–5197.
94. Passwell J. H., Harlev E., Ashkenazi S. et al. Safety and immunogenicity of improved *Shigella* O-specific polysaccharide-protein conjugate vaccines in adults in Israel // Infect. Immun. — 2001. — V. 69. — P. 1351–1357.
95. Phalipon A., Tanguy M., Grandjean C. et al. A synthetic carbohydrate-protein conjugate vaccine candidate against *Shigella flexneri* 2a infection // J. Immunol. — 2009. — V. 182. — P. 2241–2247.
96. Fu Y., Baumann M., Kosma P. et al. A synthetic glycoconjugate representing the genus-specific epitope of chlamydial lipopolysaccharide exhibits the same specificity as its natural counterpart // Infect. Immun. — 1992 — V. 60. — P. 1314–1321.
97. Pozsgay V., Kubler-Kielb J., Schneerson R., Robbins J. B. Effect of the nonreducing end of *Shigella dysenteriae* type 1 O-specific oligosaccharides on their immunogenicity as conjugates in mice // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 2007. — V. 104. — P. 14478–14482.
98. Nagy G., Pal T. Lipopolysaccharide: a tool and target in enterobacterial vaccine development // Biol. Chem. — 2008. — V. 389. — P. 513–520.
99. Beutin L., Kong Q., Feng L. et al. Development of PCR assays targeting the genes involved in synthesis and assembly of the new *Escherichia coli* O 174 and O 177 O antigens // J. Clin. Microbiol. — 2005. — V. 43. — P. 5143–5149.
100. Kim S., Frye J. G., Hu J. et al. Multiplex PCR-based method for identification of common clinical serotypes of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* // Ibid. — 2006. — V. 44. — P. 3608–3615.
101. Bogdanovich T., Carniel E., Fukushima H., Skurnik M. Use of O-antigen gene cluster-specific PCRs for the identification and O-genotyping of *Yersinia pseudotuberculosis* and *Yersinia pestis* // Ibid. — 2003. — V. 41. — P. 5103–5112.
102. Verma N. K., Quigley N. B., Reeves P. R. O-antigen variation in *Salmonella* spp.: *rfb* gene clusters of three strains // J. Bacteriol. — 1988. — V. 170. — P. 103–107.

103. Li D., Liu B., Chen M. et al. A multiplex PCR method to detect 14 *Escherichia coli* serogroups associated with urinary tract infections // J. Microbiol. Meth. — 2010. — V. 82. — P. 71–77.
104. Cai C. S., Zhu Y. Z., Zhong Y. et al. Development of O-antigen gene cluster-specific PCRs for rapid typing six epidemic serogroups of *Leptospira* in China // BMC Microbiol. — 2010. — V. 10. — P. 1–6.
105. Mullane N., O'Gaora P., Nally J. E. et al. Molecular analysis of the *Enterobacter sakazakii* O-antigen gene locus // Appl. Environ. Microbiol. — 2008. — V. 74. — P. 3783–3794.

**ЛИПОПОЛИСАХАРИДЫ
ГРАМОТРИЦАТЕЛЬНЫХ БАКТЕРИЙ:
СТРУКТУРНЫЕ ОСОБЕННОСТИ,
БИОСИНТЕЗ, ПРИМЕНЕНИЕ
В БИОТЕХНОЛОГИИ**

Р. В. Грицай
Л. Д. Варбанец

Институт микробиологии и вирусологии
им. Д. К. Заболотного НАН Украины,
Киев

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

В обзоре приведены данные об особенностях строения молекулы липополисахаридов грамотрицательных бактерий, которая содержит O-специфический полисахарид, олигосахарид кора и липид А, отличающиеся как по составу, так и по степени консервативности. Рассмотрены пути биосинтеза молекулы липополисахаридов. Показана способность липополисахаридов индуцировать образование ряда цитокинов. Описаны рецепторы, а также протеины, с которыми липополисахариды связываются в клетках макроорганизма. Поскольку липополисахариды являются главными антигенами грамотрицательных бактерий, значительное внимание уделено антигенным свойствам как самой молекулы липополисахарида, так и его структурным компонентам. Обсуждается их применение в биотехнологии.

Ключевые слова: липополисахарид, O-специфический полисахарид, олигосахарид кора, липид А, биосинтез, антигенная активность, применение в биотехнологии.

**LIPOPOLYSACCHARIDES
OF GRAM-NEGATIVE BACTERIA:
STRUCTURAL PECULIARITIES,
BIOSYNTHESIS, USE IN BIOTECHNOLOGY**

R. V. Grytsay
L. D. Varbanets

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

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

The data on peculiarities of lipopolysaccharide composition of gram-negative bacteria, including O-specific polysaccharide, oligosaccharide core and lipid A that are varied both composition and different degree of conservatism are shown in the survey. The ways of lipopolysaccharide molecule biosynthesis are considered. The ability of lipopolysaccharides to induce production of cytokines are shown. The receptors and proteins binding lipopolysaccharides with macroorganisms cells are described. So far as lipopolysaccharides are the main antigens of gram-negative bacteria, great deal of attention devoted to the antigenic properties of lipopolysaccharide molecule and its structural components. Their use in biotechnology is discussed.

Key words: lipopolysaccharide, O-specific polysaccharide, oligosaccharide core, lipid A, biosynthesis, antigenic activity, use in biotechnology.