

ХИМИЧЕСКИЕ НАУКИ

Ученые записки Таврического национального университета им. В. И. Вернадского
Серия «Биология, химия». Том 27 (66). 2014. № 4. С. 100-108.

УДК 577.181.5+615.076.7+615.281.9

КИНЕТИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ЛИПОПОЛИСАХАРИДОВ С ПОЛИМИКСИНОМ БИОЛЮМИНЕСЦЕНТНЫМ МЕТОДОМ

Кацев А.М.

*Крымский государственный медицинский университет имени С. И. Георгиевского,
Симферополь, Россия
E-mail: katsev@mail.ru*

Изучено взаимодействие липополисахаридов (эндотоксинов) бактерий *S. minnesota* и *E. coli* K235 с полимиксином В. Кинетические исследования проводили с использованием биолюминесцентного метода, основанного на измерении интенсивности свечения морских тест-бактерий в зависимости от концентрации ингибитора. В работе использовали штамм *Photobacterium leiognathi* Sh1, выделенный из вод Азовского моря автором. Показано, что при связывании липополисахаридов с антибиотиком ингибиторные свойства последнего снижаются, что выражается в восстановлении интенсивности биолюминесцентного сигнала. С использованием такого подхода расчетным и графическим методами определены константы ассоциации полимиксина и липополисахарида, которые варьировали в пределах $4,77 \cdot 10^6$ – $1,81 \cdot 10^7$ М⁻¹. Анализ литературных данных показал, что полученные значения констант совпадают с данными других физико-химических методов.

Ключевые слова: люминесцентные бактерии, липополисахарид, полимиксин.

ВВЕДЕНИЕ

Липополисахарид (ЛПС, эндотоксин) – термостабильный компонент наружной части клеточной мембраны всех грамотрицательных микроорганизмов. Он обеспечивает структурную целостность бактериальной клетки и защищает мембрану от агрессивных воздействий окружающей среды. Макромолекулы ЛПС включают три ковалентно связанных компонента: липид А; центральный олигосахарид и О-антиген. Липид А, самый консервативный элемент ЛПС, обеспечивает связь молекулы с бактериальной мембраной. После разрушения бактериальной клетки липид А высвобождается в кровь и может вызывать тяжёлые токсические последствия. Бактериальные ЛПС являются основной причиной сепсиса, а присутствие их следов в воде или лекарственных препаратах, в особенности для парентерального введения, могут обуславливать пирогенный и другие биологические эффекты [1, 2].

Действие многих антибиотиков, активных против грамотрицательных бактерий, направлено на нейтрализацию или повреждение ЛПС. Одним из таких лекарственных средств является полимиксин (ПмВ), антибиотик полипептидной природы, высокоспецифично взаимодействующий с ЛПС и нейтрализующий его токсические свойства. Связывание ПмВ с ЛПС достаточно хорошо изучено с применением различных физико-химических методов, что отражено в работах [1, 3, 4].

Целью данной работы было изучение количественного взаимодействия ЛПС с ПмВ с использованием нового бактериального биолюминесцентного метода.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для проведения кинетических исследований взаимодействия ПмВ с ЛПС использовали биолюминесцентный метод, основанный на использовании морских светящихся тест-бактерий *Photobacterium leiognathi* Sh1, выделенных из вод Азовского моря [5]. Общий дизайн эксперимента показан на рис. 1. На первом этапе изучали действие ПмВ на биолюминесценцию светящихся бактерий с установлением временных и концентрационных зависимостей (рис. 1, А). Линейные участки кривых ингибирования использовали в качестве калибровочных зависимостей для нахождения концентрации свободного антибиотика в растворе ($R^2 > 0,9$).

На втором этапе изучали действие ЛПС на светящиеся бактерии, определяя интервалы времени воздействия и концентрации, при которых не происходило ингибирования свечения (рис. 1, Б). Далее, для оценки связывания в кюветках люминометра или в 24-луночных планшетах смешивали ПмВ и ЛПС в присутствии буферного раствора и/или раствора 3% NaCl. Реакционную смесь инкубировали в течение 20–30 мин для установления равновесия, после чего прибавляли суспензию светящихся бактерий. В результате взаимодействия с ЛПС концентрация свободного ПмВ снижалась, что приводило к восстановлению свечения бактерий (рис. 1, В). Полученные данные использовали для определения констант ассоциации ПмВ–ЛПС расчетным и графическим (в координатах Скотчардта) методами.

В работе использовали препараты ЛПС *S. minnesota* (Sigma, USA), а также *E. coli* K235, который получали в лабораторных условиях по методу Вестфала [6].

Измерения биолюминесценции проводили на биолюминометре БЛМ-8801 (СКТБ «Наука», Россия)

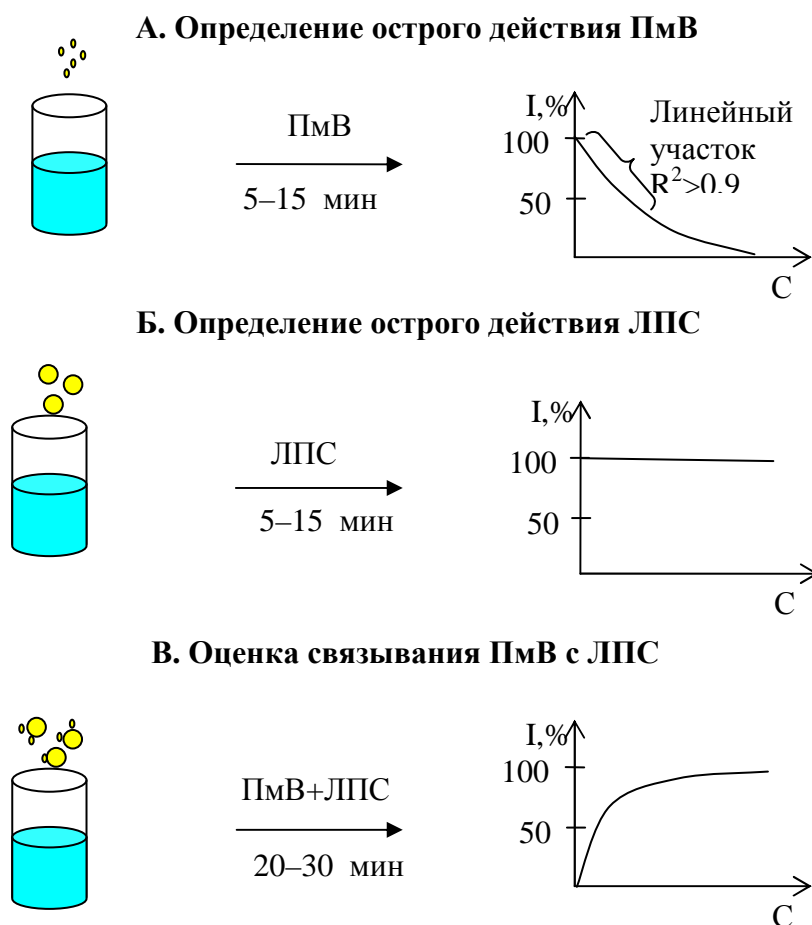


Рис. 1. Методика биолюминесцентного кинетического анализа связывания ПмВ–ЛПС.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Как было показано в работах [7, 8], биотестирование с использованием светящихся бактерий может применяться не только для определения токсичности водных сред, но и в качестве кинетического метода для оценки комплексообразования (связывания) веществ – ингибиторов свечения бактерий, с веществами, которые не влияют на их биолюминесценцию. Одной из таких комбинаций может быть пара полимиксин–липолисахарид. Реакция между ними происходит за счет взаимодействия антибиотика с консервативным элементом ЛПС, липидом А, что и приводит к частичной или полной инактивации биологических эффектов эндотоксина [1, 3].

Ранее было показано, что антибиотик ПмВ является сильным ингибитором биолюминесценции с действующей концентрацией $ЭК_{80}=0,2$ мкг/мл ($1,67 \cdot 10^{-8}$ моль/л). Связывание ПмВ с ЛПС приводило к снижению его активности,

что сопровождалось восстановлением интенсивности бактериальной люминесценции. Так, если в присутствии ПмВ, через 20 минут биолюминесценция бактерий снижалась до 10%, то внесение ЛПС от 0,3 до 2,6 мкг/мл приводило к восстановлению свечения до 25–78% от контрольных значений [7, 8].

Так как интенсивность свечения бактерий при биотестировании пропорциональна концентрации свободного антибиотика (в линейной области зависимости, рис. 1 А), то использование биолюминесцентного метода дает возможность быстрого определения параметров связывания. Как показано на рис. 2, при увеличении концентрации ПмВ, разность относительных значений биолюминесценции в присутствии и в отсутствии ЛПС возрастает и после достижения максимума снижается. Стадия нарастания связана со снижением антибиотической активности ПмВ при связывании с ЛПС, а фаза спада вызвана нарастанием концентрации свободного антибиотика, после достижения предельного связывания с ЛПС. Таким образом, ЛПС *E. coli* K235 и *S. minnesota* связывают $8,33 \cdot 10^{-8}$ моль ПмВ на 1 мг ЛПС, независимо от происхождения. Полученное значение является молярным показателем количества липида А в ЛПС, который стехиометрически (1:1) взаимодействует с молекулой антибиотика. Поскольку из-за высокой гетерогенности препаратов ЛПС определить точную величину их молекулярной массы довольно трудно, полученное соотношение связывания было использовано для выражения молярной концентрации ЛПС.

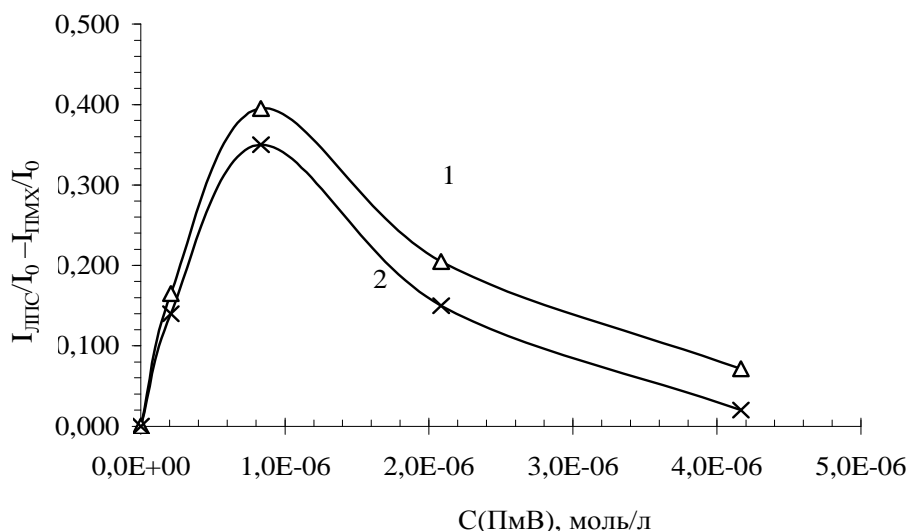


Рис. 2. Зависимость биолюминесценции бактерий от концентрации ПмВ в присутствии липополисахарида: 1 – *E. coli* K235; 2 – *S. minnesota*.

Анализ равновесного связывания ПмВ с ЛПС и определение констант ассоциации проводили расчетным способом (таблица 1 и 2). Равновесные концентрации ПмВ (L_p) определяли по интенсивности бактериальной

биолюминесценции (I, %), используя зависимость I от C в качестве калибровочной. Равновесную концентрацию комплекса ЛПС–ПмВ (V_p) определяли по формуле:

$$V_p = L_a - L_p,$$

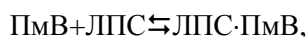
где L_a – общая концентрация ПмВ.

Равновесную концентрацию ЛПС оценивали как

$$Q_p = Q_a - V_p,$$

где Q_a – начальная концентрация ЛПС.

Принимая, что взаимодействие ПмВ с ЛПС (липидом А) можно представить в виде уравнения



то константы связывания могут быть рассчитаны по известной формуле закона действующих масс:

$$K_a = \frac{V_p}{L_p \cdot Q_p}$$

Полученные расчетным путем значения K_a для ЛПС *E. coli* K235 и *S. minnesota* были практически одинаковы и составляли в среднем $9,86 \cdot 10^6 \pm 3,66 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$ и $8,72 \cdot 10^6 \pm 6,22 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$ соответственно.

Таблица 1

Расчет констант связывания (K_{ac}) ЛПС с ПмВ

Показатели	ЛПС <i>E. coli</i> K235		ЛПС <i>S. minnesota</i>	
L_a (моль/л)	8,33E-08			
I, %	63	85,2	58	92
L_p (моль/л)	5,20E-08	2,08E-08	5,95E-08	1,13E-08
V_p (моль/л)	3,14E-08	6,25E-08	2,38E-08	7,20E-08
Q_a (моль/л)	8,45E-08	4,25E-07	8,50E-08	4,25E-07
Q_p (моль/л)	5,37E-08	3,63E-07	6,12E-08	3,53E-07
K_a	1,12E+07	8,30E+06	6,54E+06	1,80E+07
K_a (среднее)	$9,75 \cdot 10^6 \pm 2,05 \cdot 10^6$		$1,23 \cdot 10^7 \pm 8,10 \cdot 10^6$	
L_a (моль/л)	1,67E-07			
I, %	55	76,7	51,6	76,9
L_p (моль/л)	1,14E-07	5,91E-08	1,32E-07	6,30E-08
V_p (моль/л)	5,25E-08	1,08E-07	3,46E-08	1,04E-07
Q_a (моль/л)	8,45E-08	4,25E-07	8,50E-08	4,25E-07
Q_p (моль/л)	3,25E-08	3,17E-07	5,04E-08	3,21E-07
K_a	1,42E+07	5,73E+06	5,21E+06	5,12E+06
K_a (среднее)	$9,97 \cdot 10^6 \pm 5,99 \cdot 10^6$		$5,17 \cdot 10^6 \pm 6,36 \cdot 10^4$	

Таблица 2
Результаты графического метода определения констант связывания ЛПС с ПМВ

Показатель	<i>E. coli</i> K235		<i>S. minnesota</i>	
	1	2	1	2
X (L_a)	1,25E-07	7,50E-08	1,70E-07	1,10E-07
Y ($K_a \cdot L_a$)	2,85	1	0,85	0,5
K_a	2,28E+07	1,33E+07	5,00E+06	4,55E+06

Также для определения констант связывания был использован графический метод с представлением результатов в координатах Скетчардта (рис. 3, 4). При этом уравнение закона действующих масс может быть представлено в линейном виде:

$$\frac{B_p}{Q_p} = K_a \cdot L_a - K_a \cdot B_p$$

Построение такой зависимости в координатах B_p/Q_p от B_p при разных концентрациях L_a дает возможность получить значения K_a по тангенсу угла наклона прямых к оси X (отношение отрезков, отсекаемых прямыми по оси Y и X), таблица 2.

Таким образом, средние значения констант связывания ПМВ с ЛПС *E. coli* K235 и *S. minnesota*, полученные графическим методом составили, соответственно, $1,81 \cdot 10^7 \pm 6,69 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$ и $4,77 \cdot 10^6 \pm 3,21 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$, что близко к расчетным результатам (Таблица 1).

Результаты данной работы свидетельствуют о том, что взаимодействие ПМВ с ЛПС *E. coli* K235 и *S. minnesota* происходит практически одинаково. Значения K_a , определенные с помощью биолюминесцентного метода, практически совпадают с имеющимися в литературе данными, полученными другими методами. Так, по данным калориметрического титрования значения K_a для различных грамтрицательных бактерий варьировали от $1,2 \cdot 10^6$ до $8,53 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$ [1, 3]. Близкие результаты были получены и методом флуоресцентной спектроскопии [1]. Сходные значения параметров ассоциации антибиотика с липополисахаридами различных грамтрицательных бактерий свидетельствуют о том, что связывание ПМВ происходит действительно с самым консервативным элементом эндотоксина – липидом А, который имеет незначительные вариации в зависимости от родовой и видовой принадлежности бактерий [1, 2, 6].

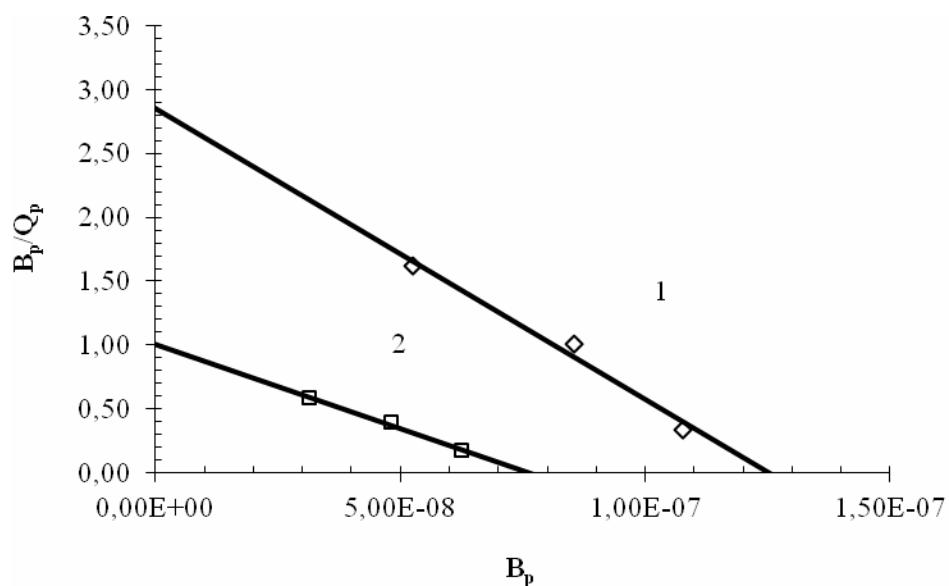


Рис. 3. Анализ связывания ЛПС *E. coli* K235 с ПмВ в координатах Скетчардта при концентрации ПмВ: 1 – 0,2 мкг/мл ($1,67 \cdot 10^{-7}$ моль/л); 2 – 0,1 мкг/мл ($8,33 \cdot 10^{-8}$ моль/л).

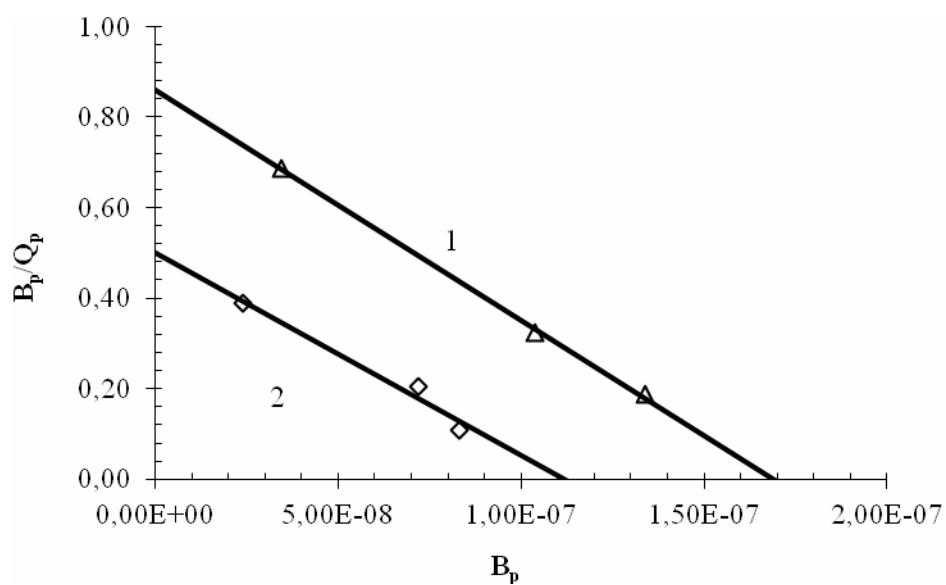


Рис. 4. Анализ связывания ЛПС *S. minnesota* с полимиксином В в координатах Скетчардта при концентрации ПмВ: 1 – 0,2 мкг/мл ($1,67 \cdot 10^{-7}$ моль/л); 2 – 0,1 мкг/мл ($8,33 \cdot 10^{-8}$ моль/л).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Изучено взаимодействие полимиксина В с ЛПС *S. minnesota* и *E. coli* K235 с применением нового биолюминесцентного метода.
2. Показано, что в равновесии 1 мг ЛПС, независимо от происхождения, связывает $8,33 \cdot 10^{-8}$ моль ПмВ.
3. С использованием расчетного и графического методов определены константы ассоциации ПмВ и ЛПС, которые варьировали в пределах $4,77 \cdot 10^6$ – $1,81 \cdot 10^7$ М⁻¹ и совпадали с имеющимися литературными данными.

Список литературы

1. Bhor V.M. Polymyxin B: an ode to an old antidote for endotoxic shock / V.M. Bhor, C.J. Thomas, N. Surolia, A. Surolia // *Mol. Biosyst.* – 2005. – Vol. 1, №3. – P. 213–222.
2. Endotoxin-neutralizing capacity of serum from cardiac surgical patients / E. Bennett-Guerrero, G.R. Barclay, P.L. Weng [et al.] // *J. Cardiothorac. Vasc. Anesth.* – 2001. – Vol. 15, № 4. – P. 451–454.
3. Srimal S. Titration calorimetric studies to elucidate the specificity of the interactions of polymyxin B with lipopolysaccharides and lipid A / S. Srimal, N. Surolia, S. Balasubramanian, A. Surolia // *Biochem J.* – 1996. – Vol. 315, Pt 2. – P. 679–686.
4. Endotoxin assay by bioluminescence using mutant firefly luciferase / K. Noda, H. Goto, Y. Murakami [et al.] // *Anal. Biochem.* – 2010. – Vol. 397, № 2. – P.152–155.
5. Кацев А. М. Новые термофильные люминесцентные бактерии, выделенные из Азовского моря // *Таврический медико-биологический вестник.* – 2014. – Т. 17, № 2. – С. 59–64.
6. Вестфаль О. Бактериальные липополисахариды / О. Вестфаль, К. Янн // *Методы химии углеводов.* – 1967. – С. 325–332.
7. Биолюминесцентный метод определения липополисахаридов / А. М. Кацев, И. Г. Онучина, А.И. Гордиенко, В. А. Белоглазов // *Таврический медико-биологический вестник.* – 2001. – Т.4, № 1-2. – С. 120–123.
8. Изучение связывания бактериальных липополисахаридов с полимиксином биолюминесцентным методом / А. М. Кацев, И. Г. Онучина, А. И. Гордиенко, В. А. Белоглазов // *Український біохімічний журнал.* – 2002. – Т. 74, № 6. – С. 103–107.

KINETIC STUDIES OF BACTERIAL LIPOPOLYSACCHARIDES INTERACTION WITH POLYMYXIN BY A BIOLUMINESCENT METHOD

Katsev A.M.

*Crimean State Medical University named after S.I. Georgievskiy, Simferopol, Crimea, Russia
E-mail: katsev@mail.ru*

Lipopolysaccharides (endotoxin), thermostable components of cell outer membrane of Gram-negative organisms, exhibit a wide range of biological functions including toxic properties. A lot of antibiotics active against gram-negative bacteria, are directed to the neutralization or damage of lipopolysaccharides. One of those drugs is a polymyxin, a polypeptide antibiotic, highly specific interacting with endotoxins and counteracting their toxic properties. Thus the aim of this study was a quantitative study of the interaction of lipopolysaccharide with polymyxin B using bacterial bioluminescent method. New marine

luminescent bacteria *Photobacterium leiognathi* Sh1, isolated from the Sea of Azov, was used as a test-strain to study kinetic characteristics of the binding.

Under the action of polymyxin, bioluminescence of test-bacteria was shown to reduce with effective concentration $EC_{80}=0.2$ mcg/ml ($1,67 \cdot 10^{-8}$ mol/l). Binding of the antibiotic with lipopolysaccharides resulted in a decrease in its activity and recovery of bacterial luminescence intensity. Endotoxins from *E. coli* K235 and *S. minnesota* were determined to bind the same amount of polymyxin - $8,33 \cdot 10^{-8}$ mol/mg, regardless of the origin. This value then was used as an indicator of the amount of lipid A of LPS in the determination of association constants (K_a) by means of calculation and graphical methods. The calculated K_a of polymyxin and LPS from *E. coli* K235 and *S. minnesota* were almost the same and averaged $9,86 \cdot 10^6 \pm 3,66 \cdot 10^6$ M⁻¹ and $8,72 \cdot 10^6 \pm 6,22 \cdot 10^6$ M⁻¹ respectively. The binding constants determined by graphical method were equal to $1,81 \cdot 10^7 \pm 6,69 \cdot 10^6$ M⁻¹ and $4,77 \cdot 10^6 \pm 3,21 \cdot 10^5$ M⁻¹.

It was noted that similar values of association constants for polymyxin and lipopolysaccharides from *E. coli* K235 and *S. minnesota* meant that the binding did occur with lipid A, the most conserved element of endotoxins, which has minor variation depending on the genus and the species of bacteria.

Keywords: luminescent bacteria, lipopolysaccharide, polymyxin.

References

1. Bhor V.M., Thomas C.J., Surolia N., Surolia A. Polymyxin B: an ode to an old antidote for endotoxic shock, *Mol. Biosyst.*, **1**(3), 213 (2005).
2. Bennett-Guerrero E., Barclay G.R., Weng P.L. [et al.] Endotoxin-neutralizing capacity of serum from cardiac surgical patients, *J. Cardiothorac. Vasc. Anesth.*, **15**(4), 451 (2001).
3. S. Srimal, N. Surolia, S. Balasubramanian, A. Surolia Titration calorimetric studies to elucidate the specificity of the interactions of polymyxin B with lipopolysaccharides and lipid A, *Biochem J.*, **315**(2), 679 (1996).
4. Noda K., Goto H., Murakami Y. [et al.] Endotoxin assay by bioluminescence using mutant firefly luciferase, *Anal. Biochem.*, **397**(2), 152 (2010).
5. Katsev A.M. New thermophilic luminescent bacteria isolated from Azov sea, *Tavrisheskiy Mediko-Biologicheskiy Vestnik*, **13**(2), 59 (2014).
6. Westphal O., Jann K. Bacterial lipopolysaccharides, *Methods of carbohydrates chemistry*, **325** (1967).
7. Katsev A.M., Onuchina I.G., Gordienko A.I., Beloglazov V.A. Bioluminescent method for lipopolysaccharides assay, *Tavrisheskiy Mediko-Biologicheskiy Vestnik*, **4**(1-2), 120 (2001).
8. Katsev A.M., Onuchina I.G., Gordienko A.I., Beloglazov V.A. Study of the binding between bacterial lipopolysaccharides and polymyxin by a bioluminescent method, *Ukrainskii biokhimicheskii zhurnal* **74** (6), 103 (2001).

Поступила в редакцию 12.11.2014 г