

УДК 577.114:575.224

## АНТИМУТАГЕННА АКТИВНІСТЬ ЛІПОПОЛІЦУКРИДУ *PSEUDOMONAS SYRINGAE* PV. *ATROFACIENS* 9400

Богдан Ю.М., Буценко Л.М., Пасічник Л.А., Гвоздяк Р.І.

**Антимутагенна активність ліпополіцукриду *Pseudomonas syringae* pv. *Atrofaciens* 9400**—Богдан Ю.М., Буценко Л.М., Пасічник Л.А., Гвоздяк Р.І. - Встановлено, що ліпополіцукрид (ЛПЦ) *P. syringae* pv. *atrofaciens* 9400 не впливає на спонтанний фон мутацій у тест-штамів *S. typhimurium*. ЛПЦ *P. syringae* pv. *atrofaciens* 9400 у дозі 1000 та 100 мкг на чашку зменшує кількість індукованих біхроматом калію мутацій у *S. typhimurium* TA98 на 45% та 42% відповідно, у *S. typhimurium* TA100 – на 41% у дозі 1000 мкг на чашку. Також, у дозі 1000 та 100 мкг на чашку ЛПЦ цього штаму зменшує кількість індукованих *N*-метил-*N'*-нітро-*N'*-нітросогуанідином мутацій у *S. typhimurium* TA100 на 35% та 33% відповідно. Таким чином, ЛПЦ *P. syringae* pv. *atrofaciens* 9400 виявляє антимутагенну активність.

**Ключові слова:** *P. syringae* pv. *atrofaciens*, ліпополіцукрид, антимутагенна дія.

**Адреса:** Інститут мікробіології і вірусології НАН України, Д03680 м. Київ, МСП, вул. Академіка Заболотного, 154, e-mail: phytopath@imv.kiev.ua

*It was established that lipopolysaccharide (LPS) of P. syringae pv. atrofaciens 9400 did not affect the rate of test-strains S. typhimurium spontaneous mutation. LPS P. syringae pv. atrofaciens 9400 decreased the number of S. typhimurium TA98 mutation induced by potassium dichromate on 45% and 42% in dose 1000 and 100 µg per plate respectively, and decreased the number of S. typhimurium TA100 mutation induced by potassium dichromate on 41% in dose 1000 µg per plate. Besides, LPS decreased the number of S. typhimurium TA100 mutation induced by N-methyl-N'-nitro-N'-nitrosoguanidine on 35% and 33% in dose 1000 and 100 µg per plate respectively. Thereby, LPS P. syringae pv. atrofaciens 9400 revealed antimutagenicity.*

### Вступ

Відомо, що патогенні для людини і тварин мікроорганізми, а також їхні метаболіти, зокрема токсини, можуть спричиняти зростання кількості мутацій в організмі хазяїна [6]. Добре відомо, що афлатоксини, які утворюються переважно двома видами *Aspergillus*, виявляють мутагенну активність. Зокрема, афлатоксин В1 є генотоксичним у прокаріотичних та еукаріотичних тест-системах *in vitro* (у тому числі й для клітин людини), а також *in vivo* для людини та низки видів тварин. Він утворює зшивки між ДНК і білком, а також індукує генетичні мутації та хромосомні аберації [7]. Окадаєва кислота, яка продукується дінофлагелятами та спричинює інтоксикацію у людей, може впливати на розходження хромосом під час мітозу і, таким чином, – на процеси канцерогенезу [9]. Крім того, патогенні для людини бактерії *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Escherichia coli*, *Haemophilus ducreyi*, *Helicobacter* spp., *Campylobacter jejuni*, *C. coli*, *C. fetus* та *Shigella* spp. продукують білкові токсини, яким притаманна ДНКазна активність. Ці токсини можуть

проникати у клітини хазяїна та блокувати клітинний цикл у G<sub>2</sub>-фазі [8].

Одним із добре охарактеризованих токсинів грамнегативних бактерій є ліпополіцукриди (ЛПЦ), також відомі як ендотоксини. Вони є унікальними біополімерами, які відіграють значну роль в інфікуванні та розвитку патологічних процесів в організмі хазяїна. ЛПЦ є поверхневими структурами клітин і здатні стимулювати синтез антитіл у макроорганізмі та індукувати гуморальну відповідь [1]. Оскільки відомо, що деякі фітопатогенні бактерії здатні спричиняти захворювання у людей [3], то вивчення біологічних властивостей їхніх ендотоксинів є актуальним. Раніше було показано, що ЛПЦ, виділені з фітопатогенних бактерій *P. syringae* pv. *atrofaciens* 8281 і *P. syringae* pv. *coronafaciens* 9030, не виявляли мутагенної активності у тесті Еймса. Натомість, згадані біополімери володіли антимутагенною дією щодо індукованих біхроматом мутацій у тест-штамів *Salmonella typhimurium* [2, 4].

**Метою даної роботи** було вивчити антимутагенну активність ЛПЦ фітопатогена *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens* 9400 щодо

індукованих біхроматом калію та N-метил-N'-нітро-N'-нітрозогуанідном мутацій.

## Матеріали і методи

Об'єктом дослідження був ЛПЦ штаму 9400 *P. syringae* pv. *atofaciens* (McCulloch 1920) Young et al. 1978. Цей штам було ізольовано із ураженого листя пшениці ярої сорту Рання 93. Штам патогенний для рослин пшениці, індукує реакцію надчутливості в листі тютюну.

ЛПЦ *P. syringae* pv. *atofaciens* 9400 одержували екстракцією 0,85%-им розчином хлориду натрію [5]. Для одержання ЛПЦ з клітин *P. syringae* pv. *atofaciens* 9400 бактерій культивували на картопляному агарі протягом 24 год при 28 °С.

Токсичність ЛПЦ для тест-штамів *Salmonella typhimurium* TA98 та *S. typhimurium* TA100 оцінювали, вносячи його у пробірку з 20 мл м'ясопептонного бульйону у дозах 0,1; 1,0; 10,0; 100,0 та 1000,0 мкг. У кожен пробірку додавали 1 мл суспензії культури *S. typhimurium* TA98 або *S. typhimurium* TA100 титром  $10^{10}$  клітин/мл і культивували при температурі 37°С. Оптичну щільність культуральної рідини вимірювали через 24 години на мікроколориметрі МКМФ-1 за довжини хвилі 540 нм.

Мутагенну та антимутагенну активність ЛПЦ визначали у стандартному напівкількісному тесті Еймса [10]. Під час виконання тесту використано два штами *S. typhimurium* з різними мутаціями: *S. typhimurium* TA98, який у гістидиновому опероні має мутації по типу зсуву рамки зчитування *hisD3052*, та *S. typhimurium* TA100, який у

гістидиновому опероні має мутації по типу заміни пар основ *hisG46*. Крім того, обидва штами мають додаткові мутації – мутації синтезу ЛПЦ *rfa* (для підвищення проникності зовнішньої мембрани для високомолекулярних речовин), мутації системи репарації *DuvrB* (для підвищення частоти мутацій під дією різноманітних мутагенів, пошкоджувальний вплив яких міг би виправлятися вказаною системою репарації), а також містять плазмиду стійкості до ампіциліну рKM101. Наявність статистично значимих відмінностей визначали за допомогою *t*-критерію Стьюдента.

Під час визначення антимутагенної активності ЛПЦ у якості позитивного мутагену використовували біхромат калію у дозі 200 мкг та N-метил-N'-нітро-N'-нітрозогуанідин у дозі 2 мкг. ЛПЦ *P. syringae* pv. *atofaciens* 9400 вносили у дозах від 0,1 до 1000 мкг на чашку. Зменшення кількості індукованих мутацій (*X*) визначали за формулою, (%):

$$X = 100 \frac{\text{кількість колоній в досліді} - \text{спонтанний фон мутацій}}{\text{кількість колоній в позитивному контролі} - \text{спонтанний фон мутацій}} \times 100\%$$

## Результати та їх обговорення

Одержаний нами ЛПЦ не впливав на ріст *S. typhimurium* TA98 у дозах 1000 та 100 мкг (рис. 1). У той же час спостерігалось незначне пригнічення росту культури *S. typhimurium* TA100 за умови внесення ЛПЦ у дозах 1000 та 100 мкг. Проте статистично значимих відмінностей між дослідом та контролем не було виявлено. Таким чином, ЛПЦ *P. syringae* pv. *atofaciens* 9400 не має токсичного впливу на тест-штами *S. typhimurium*.

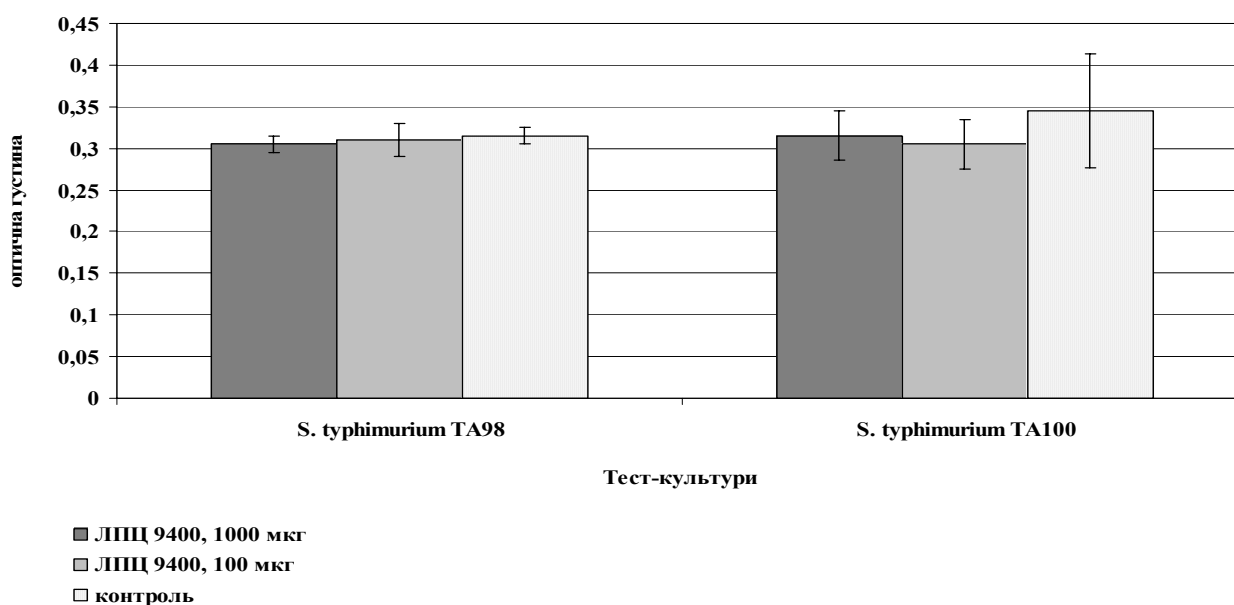


Рис. 1. Вплив ЛПЦ *P. syringae* pv. *atofaciens* 9400 на ріст культур *S. typhimurium* TA98 та *S. typhimurium* TA100.

Результати проведених дослідів у тесті Еймса вказують на відсутність мутагенної активності ЛПЦ *P. syringae* pv. *atrofaciens* 9400. Так, у разі внесення одержаного нами ЛПЦ у дозах від 0,1 до 1000 мкг на чашку кількість колоній His<sup>+</sup>-ревертантів *S. typhimurium* TA98 становила 30 - 38 на чашку, а спонтанний фон мутацій даного тест-штаму – 31 ± 3 колоній на чашку. Для тест-штаму *S. typhimurium* TA100 за внесення ЛПЦ *P. syringae* pv. *atrofaciens* 9400 у дозах від 0,1 до 1000 мкг на чашку кількість колоній His<sup>+</sup>-ревертантів

становила 130 - 148 на чашку, а спонтанний фон мутацій – 129 ± 10 колоній на чашку (рис. 2). Отже, у випадку внесення ЛПЦ у дозах від 0,1 до 1000 мкг, фон мутацій тест-штамів *S. typhimurium* не відрізнялися від спонтанного. За умови внесення біхромату калію у позитивному контролі в дозі 200 мкг на чашку кількість колоній His<sup>+</sup>-ревертантів становила 1103 ± 243 для *S. typhimurium* TA98 та 1187 ± 133 для *S. typhimurium* TA100, що перевищувало спонтанний фон мутацій тест-штамів у 36 та 9 разів відповідно.

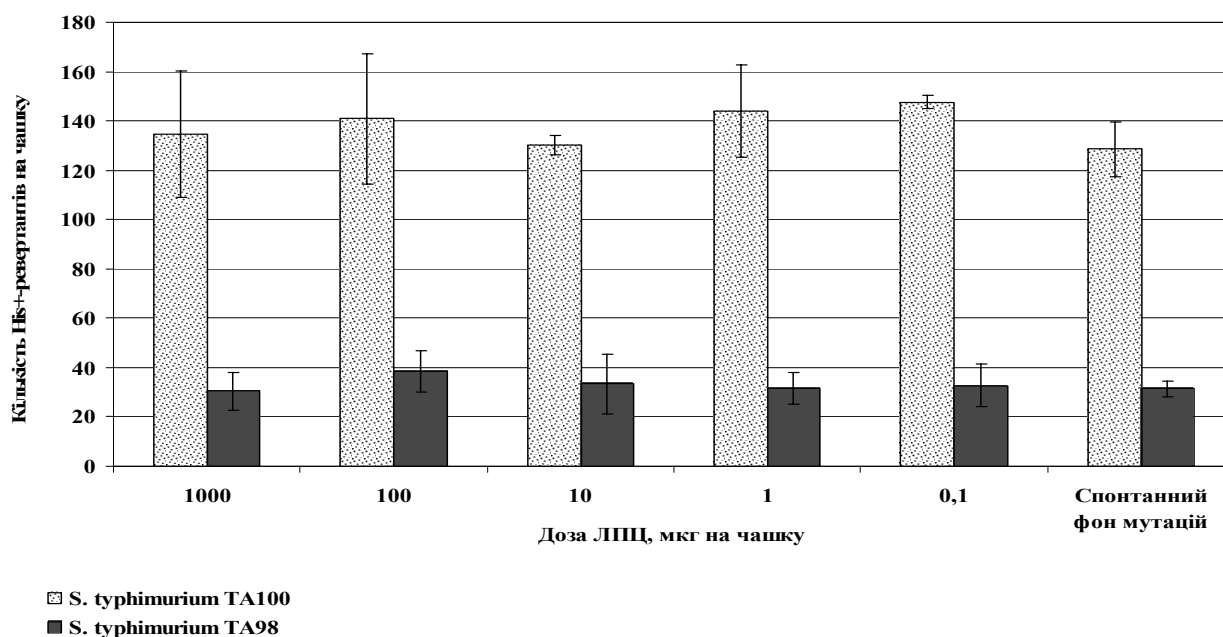


Рис. 2. Вплив ЛПЦ *P. syringae* pv. *atrofaciens* 9400 на кількість His<sup>+</sup>-ревертантів *S. typhimurium* TA98 та *S. typhimurium* TA100.

Таким чином, експериментально встановлено, що одержаний 0,85%-м розчином хлориду натрію ЛПЦ *P. syringae* pv. *atrofaciens* 9400 не мав мутагенної активності у стандартному тесті Еймса.

Натомість, ЛПЦ *P. syringae* pv. *atrofaciens* 9400 проявляв антимутагенну активність щодо індукованих біхроматом калію мутацій у *S. typhimurium* TA98 і *S. typhimurium* TA100. Так, у дозі 1000 мкг на чашку даний ЛПЦ викликав достовірне зменшення кількості індукованих біхроматом калію His<sup>+</sup>-реверсій на 45 %, а в дозі 100 мкг на чашку – на 42 % у *S. typhimurium* TA98. Крім того, одержаний нами ЛПЦ викликав зменшення His<sup>+</sup>-реверсій у *S. typhimurium* TA100 на 41 % у дозі 1000 мкг на чашку (табл. 1). У дозах, менших за 100 мкг на чашку, статистично значимого зменшення кількості індукованих біхроматом калію мутацій не спостерігали. Подібні результати одержали у випадку використання в якості позитивного мутагена N-метил-N'-нітро-N'-нітрозогуанідину. Так, у дозі 1000 мкг на чашку ЛПЦ викликав статистично

значиме зменшення кількості індукованих N-метил-N'-нітро-N'-нітрозогуанідину мутацій у *S. typhimurium* TA100 на 35 %, а в дозі 100 мкг на чашку – на 33% (табл. 2.).

Досліджений нами ЛПЦ *P. syringae* pv. *atrofaciens* 9400 виявляв дещо меншу здатність зменшувати індуковані біхроматом калію мутацій у тест-штамів *S. typhimurium* порівняно з ЛПЦ, виділеного з *P. syringae* pv. *atrofaciens* 8281 [2]. Так, ЛПЦ *P. syringae* pv. *atrofaciens* 8281 у дозі 1000 мкг зменшував індуковані мутації на 78% у *S. typhimurium* TA98, що майже у 2 рази більше порівняно з активністю ЛПЦ *P. syringae* pv. *atrofaciens* 9400. У той же час, антимутагенна дія одержаного нами ЛПЦ практично не відрізнялася від такої у ЛПЦ *P. syringae* pv. *coronafaciens* 9030, який спричинював зменшення індукованих біхроматом калію мутацій у *S. typhimurium* TA98 та *S. typhimurium* TA100 на 51% та 48% відповідно [4].

Таблиця 1. Вплив ЛПЦ *P. syringae* pv. *atofaciens* 9400 на кількість індукованих біхроматом калію мутацій у *S. typhimurium* TA98 та *S. typhimurium* TA100

Тест-штам	Доза ЛПЦ <i>P. syringae</i> pv. <i>atofaciens</i> 9400, мкг на чашку	Доза біхромату калію, мкг на чашку	Кількість колоній His <sup>+</sup> -ревертантів на чашку	Зменшення індукованих біхроматом калію мутацій, %
<i>S. typhimurium</i> TA98	1000	200	555 ± 58	45
	100	200	586 ± 15	42
	10	200	772 ± 147	-
	1	200	809 ± 177	-
	0,1	200	725 ± 254	-
	-	200	958 ± 33	-
	Спонтанний фон мутацій			70 ± 2
<i>S. typhimurium</i> TA100	1000	200	3827 ± 129	41
	100	200	4517 ± 155	-
	10	200	4680 ± 248	-
	1	200	4032 ± 615	-
	0,1	200	6091 ± 358	-
	-	200	5797 ± 587	-
	Спонтанний фон мутацій			967 ± 87

Примітка: “-” – статистично значимі відмінності між дослідом та контролем відсутні.

Таблиця 2. Вплив ЛПЦ *P. syringae* pv. *atofaciens* 9400 на кількість індукованих N-метил-N'-нітро-N'-нітрозогуанідином мутацій у *S. typhimurium* TA100

Доза ЛПЦ <i>P. syringae</i> pv. <i>atofaciens</i> 9400, мкг на чашку	Доза N-метил-N'-нітро-N'-нітрозогуанідину, мкг на чашку	Кількість колоній His <sup>+</sup> -ревертантів на чашку	Зменшення індукованих N-метил-N'-нітро-N'-нітрозогуанідином мутацій, %
1000	2	7296 ± 42	35
100	2	7464 ± 200	33
10	2	10520 ± 408	-
1	2	9712 ± 592	-
0,1	2	10744 ± 104	-
-	2	11200 ± 917	-
Спонтанний фон мутацій		247 ± 24	

Примітка: “-” – статистично значимі відмінності між дослідом та контролем відсутні.

Таким чином, було встановлено, що ЛПЦ *P. syringae* pv. *atofaciens* 9400 не виявляє мутагенної активності у тесті Еймса. У той же час ЛПЦ володіє антимуагенною дією щодо індукованих біхроматом калію та N-метил-N'-нітро-N'-

нітрозогуанідином мутацій у тест-штамів *S. typhimurium*. Визначення механізму антимуагенної дії вивченого нами ЛПЦ потребує подальших досліджень

Варбанец Л.Д., Винарская Н.В. Структура, функция, биологическая активность эндотоксинов грамотрицательных бактерий // Сучасні проблеми токсикології. – 2002. – № 1. – С. 9-13.

Вашенко Л.М., Пасічник Л.А., Гвоздяк Р.І. Вплив ліпополісахариду *Pseudomonas syringae* pv. *atofaciens* на спонтанні та індуковані біхроматом калію мутації у *Salmonella typhimurium* // Біополімери і клітина. – 2004. – Т.20, №4. – С. 295 – 299.

Гвоздяк Р.І. Полибиотрофия бактерий // Микробиологический журнал – 1981. – Т. 43, № 2. – С. 256 – 262.

Гвоздяк Р.І., Вашенко Л.М., Пасічник Л.А. Генотекторна активність ліпополісахариду *Pseudomonas syringae* pv. *coronafaciens* 9030 // Доповіді НАНУ. – 2003. – № 4. – С. 159 – 162.

Захарова И.Я., Косенко Л.В. Методы изучения микробных полисахаридов. – К.: Наук. думка, 1982. – 192 с.

Ильинских Н.Н., Бочаров Е.Ф., Ильинских И.Н. Инфекционный мутагенез. – Новосибирск: Наука, 1984. – 168 с.

Aflatoxins (Group 1) [Електронний ресурс] // International Agency for Research on Cancer (IARC) - Summaries & Evaluations. – 2002. – Vol. 82. – P. 171. – Режим доступу: <http://www.inchem.org/documents/iarc/vol82/82-04.html>

Hassane D.C., Lee R.B., Mendenhall M.D., Pickett C.L. Cytolethal distending toxin demonstrates genotoxic activity in a yeast model // Infection and Immunity. – 2001. – Vol. 69, № 9. – P. 5752–5759.

Hegarar L.L., Puech L., Fessard V., Poul J.M., Dragacci S. Aneugenic potential of okadaic acid revealed by the micronucleus assay combined with the FISH technique in CHO-K1 cells // Mutagenesis. – 2003. – Vol.18, № 3. – P.293–298.

Maron D.M., Ames B.N. Revised methods for the Salmonella mutagenicity test // Mutation Research / Environmental Mutagenesis and Related Subjects. – 1983. – Vol. 113, № 3-4. – P. 173-215.

Отримано: 11 csxyz 2007 р.

Прийнято до друку: 12 травня 2008 р.