

ACTION OF LIPOPOLYSACCHARIDE *P. SYRINGAE* PV. *ATROFACIENS* UKM B 4394 ON TUMOROGENESIS INDUCED BY *A. TUMEFACIENS*

E. Tereshchuk

National University of Food Technologies

Key words:

Pseudomonas syringae
pv. atrofaciens
Lipopolysaccharide
Tumorigenesis
Explants
Inducing

Article history:

Received 15.02.2013
Received in revised form
27.02.2013
Accepted 1.04.2013

Corresponding author:

E. Tereshchuk
E-mail:
olenka.tereshchuk@mail.ru

ABSTRACT

The effect of lipopolysaccharide *Pseudomonas syringae* *pv. atrofaciens* UKM B 4394 on the formation of tumors on potato explant induced by *A. tumefaciens* has been investigated. It is stated that the treatment of explants with lipopolysaccharide *P. syringae* *pv. atrofaciens* UKM B 4394 solution in concentration of 10 mg/ml resulted in a reduction of tumors by 79 %. The use of lipopolysaccharide solution in concentrations of 1.0 mg/ml and 0.1 mg/ml has also suppressed the tumorigenesis, but to a lesser degree.

ДІЯ ЛІПОПОЛІСАХАРИДУ *P. SYRINGAE* PV. *ATROFACIENS* УКМ В 4394 НА ПУХЛИНОУТВОРЕННЯ ІНДУКОВАНЕ *A. TUMEFACIENS*

О.О. Терещук

Національний університет харчових технологій

Досліджено вплив ліпополісахариду *Pseudomonas syringae* *pv. atrofaciens* УКМ В 4394 на процес утворення пухлин на експлантатах картоплі індукованої *A. tumefaciens*. Встановлено, що обробка експлантів розчином ліпополісахариду *P. syringae* *pv. atrofaciens* УКМ В 4394 концентрацією 10 мг/мл приводила до зменшення пухлин на 79 %. Використання розчину ліпополісахариду в концентраціях 1,0 мг/мл і 0,1 мг/мл також пригнічували пухлиноутворення, але в меншому ступені.

Ключові слова: *Pseudomonas syringae* *pv. atrofaciens*, ліпополісахариди, пухлиноутворення, експлантати, індукування.

Ліпополісахариди (ЛПС) — це термостабільні біополімери, що виробляються грамнегативними бактеріями. Вони є основною поверхневою структурою грамнегативних бактерій, яка відіграє важливу роль у взаємодії мікро- та макроорганізму. Безпосередній контакт молекули із зовнішнім середовищем значною мірою зумовлює функції цих біополімерів у мікробній клітині. Встановлено, що ЛПС бере участь у регуляції проникності зовнішньої мембрани для різних речовин, захищаючи клітину від дії багатьох детергентів, отрут, антибіотиків. ЛПС отриманий з представників різних груп

грамнегативних бактерій, як правило, складається з гідрофільного гетерополісахариду, в якому розрізняють О-специфічний ланцюг і коровий олігосахарид, та ковалентно приєднаного до нього ліпідного компонента — ліпиду А [7].

ЛПС привертають велику увагу дослідників завдяки наявності у них широкого спектра біологічної активності, в тому числі їхньої здатності впливати на імунну систему макроорганізмів. У патогенних для ссавців бактерій ЛПС відіграють важливу роль у процесі інфікування та розвитку патологічних змін. ЛПС взаємодіють з клітинами макроорганізму, індуючи синтез різних активних сполук. При цьому спостерігається активація систем клітинного і гуморального імунітету тварин, що призводить до таких біологічних як лихоманка, зміни в складі крові, а в дуже високих концентраціях, до септичного шоку [6].

При вивченні впливу на пухлиноутворення ЛПС фітопатогенних бактерій одержано досить суперечливі результати. Так ЛПС *Ralstonia solanacearum* у дозі 10 мкг/мл здатний прискорювати темпи росту первинної пухлини карциноми легенів Льюїса, меланоми В-16, саркоми S-37, але йому також властива антиметастатична дія [1]. ЛПС і його О-специфічний полісахарид сприяють зменшенню об'єму і кількості метастазів на 60 – 70 % і 40 – 50 % відповідно. Показано, що ЛПС деяких патоварів *P. syringae* має слабку протипухлинну активність стосовно карциноми Ерліха. Натомість ЛПС штамів *P. syringae* pv. *syringae* 281, *P. syringae* pv. *maculicola* 381, *P. syringae* pv. *syringae* (*cerasi*) 435, *P. syringae* pv. *syringae* (*cerasi*) 467, *P. syringae* pv. *tabaci* 223, *P. syringae* pv. *lachrymans* 7591, *P. syringae* pv. *tomato* 141R виявили стимулюючу активність в цьому тесті [9].

Відомо, що мутагенез та канцерогенез мають багато спільного, тому ми припустили, що ЛПС *P. syringae* pv. *atropfaciens* 4394, який виявляє антимутагенну активність [3], може мати і антиканцерогенні властивості. Метою роботи стало вивчення впливу ЛПС *P. syringae* pv. *atropfaciens* 4394 на пухлиноутворення.

В роботі досліджували ЛПС *Pseudomonas syringae* pv. *atropfaciens* (McCulloch 1920) Young, Dye and Wilkie 1978 УКМ В 4394. Для одержання ЛПС бактерії *P. syringae* pv. *atropfaciens* УКМ В 4394 вирощували на картопляному агарі 24 – 48 год, при 28 °С, біомасу змивали фізіологічним розчином, клітини осаджували центрифугуванням (5 тис. об/хв, 40 хв.). ЛПС отримували екстрагуванням 0,85 % розчином хлориду натрію з сирої біомаси клітин, оскільки такий метод є найбільш опадливим і дозволяє отримати препарат з збереженою структурою та біологічною активністю [5]. В одержаному ЛПС визначали вміст білка методом Лоурі [8], вуглеводів — за реакцією з фенолом та сірчаною кислотою, 2-кетодезоксиоктоновою кислоти — за реакцією з тіобарбітуровою кислотою [5].

Вивчення впливу ЛПС на пухлиноутворення у рослин здійснювали в системі експлантати картоплі — *A. tumefaciens* [4].

Експлантати картоплі в стерильних умовах індукували *A. tumefaciens*. Після 3-х тижнів інкубації експлантатів при температурі 20 °С враховували кількість пухлин, які утворилися та їх інтенсивний розвиток.

Для вивчення впливу ЛПС *P. syringae* pv. *atropfaciens* УКМ В 4394 на тест-штами *A. tumefaciens* його додавали до середовища, на якому культивували *A. tumefaciens*. Після 24 год культивування при температурі 28 °С враховували кількість колоній *A. tumefaciens*.

Виділення ЛПС зі збереженою структурою має важливе значення для вивчення їхніх біологічних властивостей, тому для одержання ЛПС було використано 0,85 % розчин хлориду натрію. Було визначено, що препарат ЛПС містить значну кількість вуглеводів — 31,8 %, що відрізняє фітопатогенні види бактерій роду *Pseudomonas* від інших представників роду, які характеризуються тим, що мають в своєму складі низький вміст вуглеводів (до 20 %). Значну кількість білків — 20 %. У складі ЛПС міститься 3,6 % нуклеїнових кислот та 1,50 % 2-кетоз-дезоксиктонової кислоти (КДО), яка завжди присутня в ЛПС грамнегативних бактерій та є своєрідним маркером, який свідчить про ліпополісахаридну природу виділеної речовини.

Встановлено, що ЛПС *P. syringae* pv. *atropfaciens* УКМ В 4394 виявляв протипухлинну активність щодо індукованого *A. tumefaciens* пухлиноутворення на експлантатах картоплі (табл. 1).

МІКРОБІОЛОГІЯ

Таблиця 1. Вплив ліпополісахариду *P. syringae* pv. *atropfaciens* УКМ В 4394 на пухлиноутворення на експлантатах картоплі

Штам <i>A. tumefaciens</i>	Оброблення експлантатів	Кількість експлантатів без пухлин, % до загальної кількості	Кількість пухлин на один експлантат	Зменшення кількості пухлин, %
9052	Позитивний контроль*	0	17,0±2,2	0
	ЛПС, 10,0 мг/мл	12	3,6±1,2	79
	ЛПС, 1,0 мг/мл	7	8,5±2,3	50
	ЛПС, 0,1 мг/мл	2	12,3±2,4	28
* — Необроблені експлантати інокулювали культурою <i>A. tumefaciens</i> .				

Протипухлинна активність залежала від концентрації розчину ЛПС. Оброблення експлантатів розчином ЛПС у концентрації 10 мг/мл зменшувало кількість пухлин на 79 % порівняно з позитивним контролем. При зменшенні концентрації ЛПС і знижувалася протипухлинна дія. Проте використання навіть 1,0 мг/мл розчину пригнічувало пухлиноутворення на 50 %, а використання розчину концентрацією 0,1 мг/мл — на 28 %.

Раніше при вивченні впливу на пухлиноутворення на експлантатах картоплі індуковане *A. tumefaciens* ЛПС інших штамів виду *P. syringae* отримані подібні результати [2].

Висновки

Таким чином, в результаті проведеної роботи встановлено, що ЛПС *P. syringae* pv. *atropfaciens* УКМ В 4394 виявляв здатність пригнічувати щодо індукованого *A. tumefaciens* пухлиноутворення на експлантатах картоплі.

Література

1. Варбанець Л.Д., Шалько Ю.П., Придатко О.Е., Жукова Е.В., Москаленко Н.В. Биологическая активность липополисахарида *Pseudomonas solanacearum* // Мікробіол. журн. — 1995. — Т. 57, № 2. — С. 80 – 85.
2. Ващенко Л.М., Гвоздяк Р.І., Пасічник Л.А. Протипухлинна активність ліпополісахариду *P. syringae* pv. *coronafaciens* // Науковий вісник УжУ, серія: Біологія. — 2005. — Вип.16. — С. 17 – 22.
3. Ващенко Л.М., Гвоздяк Р.І., Пасічник Л.А. Антимутагенні властивості ліпополісахариду *Pseudomonas syringae* pv. *coronafaciens* 9030 // Науковий вісник УжНУ, серія: Біологія. — 2001. — № 9. — С. 145 – 147.
4. Гвоздяк Р.І., Сарнацька В.В., Гладун Г.О., Мартинюк Н.Б., Болоховська В.А. Вплив відходів мікробіологічної промисловості на індукцію пухлин у картоплі, спричинених *Agrobacterium tumefaciens* // Мікробіол. журн. — 1998. — Т. 60, № 3. — С. 50 – 56.
5. Захарова И.Я., Косенко Л.В. Методы изучения микробных полисахаридов. — К.: Наук. думка, 1982. — 189 с.
6. Здоровенко Е.Л., Позур В.К., Кучеренко М.С. Біологічна активність ліпополісахаридів грамнегативних бактерій // Биополимеры и клетка. — 2000. — Т. 16, № 2. — С. 5 – 15.
7. Структура і біологічна активність бактеріальних біополімерів / В. К. Позур, Д. В. Колюбо, Л. Д. Варбанець [та ін.]. — К.: Видавничо-поліграфічний центр «Київський університет», 2003. — 305 с.
8. Lowry O., Rosenbrough N., Farr A., Randall R. Protein measurement with the Folin reagent // J. Biol. Chem. — 1951. — Vol. 133, № 1. — P. 265 – 275.

9. Zdorovenko G.M., Knirel Yu., Gvozdyak R.I., Yakovleva L.M. Structural features and biological activities of the *Pseudomonas syringae* lipopolysaccharides // Intern. regional seminar Environment protection: modern studies in ecology and microbiology (Ukraine, Uzhgorod, May 13–16, 1997): Proceedings. — Uzhgorod, 1997. — Vol. 2. — P. 187 – 191.

**ДЕЙСТВИЕ ЛИПОПОЛИСАХАРИДА
P. SYRINGAE PV. ATROFACIENS УКМ В 4394
НА ОПУХОЛЕОБРАЗОВАНИЕ ИНДУЦИРОВАННОЕ
A. TUMEFACIENS**

Е.А. Терещук

Национальный университет пищевых технологий

*Исследовано влияние липополисахарида *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens* УКМ В 4394 на процесс образования опухолей в эксплантатах картофеля индуцированной *A. tumefaciens*. Установлено, что обработка эксплантатов раствором липополисахарида *P. syringae* pv. *atrofaciens* УКМ В 4394 концентрацией 10 мг / мл приводила к уменьшению опухолей на 79 %. Использование раствора липополисахарида в концентрациях 1,0 мг/мл и 0,1 мг / мл также подавляли опухолеобразование, но в меньшей степени.*

Ключевые слова: *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens*, липополисахариды, опухолеобразование, эксплантаты, индуцирование.