

Т. Г. ВАСИЛЬЕВА, Г. И. САЗОНЕЦ, Н. И. ШАПИРО

**ХАРАКТЕРИСТИКА МОЛЕКУЛЯРНОВЕСОВЫХ ПАРАМЕТРОВ
ВЫСОКОАКТИВНОГО КРУПНОМОЛЕКУЛЯРНОГО КОМПОНЕНТА
ЭНДОТОКСИНОВ *SALMONELLA PARATYPHI* В. ПО ДАННЫМ
СВЕТОРАССЕЯНИЯ И ЭЛЕКТРОННОЙ МИКРОСКОПИИ**

(Представлено академиком Е. М. Крепом 22 I 1973)

Эндоотоксины грам-отрицательных бактерий, представляющие собой сложные высокомолекулярные липополисахаридно-белковые комплексы и обладающие широким спектром действия на макроорганизм, привлекают сейчас все большее внимание исследователей. Однако при изучении биологических и химических свойств эндотоксина его не подвергают специальной очистке и фракционированию. Между тем исследованиями последних лет убедительно показана химическая, физическая и биологическая гетерогенность эндотоксинов (¹⁻³).

Работы, проведенные нами ранее на модели эндотоксинов *Salmonella paratyphi* В., показали, что препараты эндотоксинов, независимо от метода их выделения, характеризуются значительной гетерогенностью (^{4, 1-3}). Техника гель-фильтрации через колонки 2% агарового геля или сефарозы 2В позволяет разделить эндотоксины на фракции, существенно различающиеся по молекулярновесовым параметрам, химическому составу и биологической активности. Наибольшей биологической активностью (антигенность, иммуногенность, токсичность, стрессорное действие) обладает первая, наиболее крупномолекулярная фракция. Активность этой фракции превышает не только активность других более низкомолекулярных фракций, но и активность исходного препарата эндотоксина. По-видимому, эта фракция представляет собой очищенный препарат эндотоксина, свободный от примесей веществ с близким молекулярным весом (белки, полисахариды, фрагменты нуклеиновых кислот), загрязняющих препараты эндотоксинов, но не обладающих характерным комплексом биологических свойств.

В настоящее время большинство исследователей связывает биологические свойства эндотоксина с его размерами, считая, что для проявления биологической активности необходима определенная критическая величина молекулы эндотоксина (м.в. не менее 1 млн) (^{5, 6}). Были сделаны попытки определить молекулярный вес эндотоксинов (^{5, 7}), однако уникальность объекта исследования (очень большой молекулярный вес эндотоксинов, их гетерогенность и способность к агрегации и комплексообразованию) делает полученные результаты недостаточно достоверными.

Представлялось интересным определить те молекулярновесовые параметры, которые характерны для проявления максимальной биологической активности эндотоксина. В отличие от предшествующих работ, исследование проводилось не на суммарных исходных препаратах эндотоксинов, а на специально очищенных путем гель-фильтрации через колонки сефарозы 2В.

Исследование проведено на модели эндотоксинов *Salmonella paratyphi* В., полученных методом ферментативного переваривания Райстрика — Топпи (⁸). Растворы эндотоксинов наносили на колонки сефарозы 2В, а затем элюировали дистиллированной водой. Непосредственным объектом ис-

следования служила первая, наиболее высокомолекулярная и высокоактивная фракция. Условия фракционирования и биологическая характеристика полученных фракций приведены в наших предыдущих работах (⁴, ¹).

Для определения молекулярно-весовых параметров использовали метод светорассеяния, позволяющий определить величину молекулярного веса, размеры макромолекул и степень полидисперсности. В области молекулярных весов $10^5 - 10^7$ могут применяться методы светорассеяния и сочетание седиментации с диффузией. Метод светорассеяния лучше обоснован теоретически, однако проведение эксперимента требует исключительной чистоты растворов, в том числе отсутствия в них механических примесей (пыль).

Работа выполнена на фотоэлектрическом нефелометре «Photogoniometer» фирмы «Sofica» (Франция). Предварительное обеспыливание растворов и растворителей проводили на препаративной ультрацентрифуге «Spinco» L-2-65B при 25000 об/мин в течение 60 мин. Интенсивность рассеяния света измеряли при углах 45°, 60, 75, 90, 105, 120, 135° используя ряд последовательных разведений исходного препарата: C , $\frac{3}{4}C$, $\frac{1}{2}C$, $\frac{3}{8}C$, причем максимальная исходная концентрация (C) после обеспыливания составляла $4,56 \cdot 10^{-5}$ г/см². В качестве растворителя использовали дистиллированную воду, так как, по полученным ранее данным, комплексы эндотоксинов диссоциируют в растворах с повышенной ионной силой (⁹). Инкремент показателя преломления определяли с помощью дифференциального рефрактометра типа «Пульфрих». В качестве эталона при измерении интенсивности рассеяния света использовали криоскопический бензол, специально очищенный.

Экспериментальные данные оценивались по методу двойной экстраполяции Зимма, описание которого можно найти во многих специальных руководствах (¹⁰⁻¹²). Данные интенсивности рассеяния света, измеренные для ряда концентраций растворенного вещества и различных углов рассеяния θ , графически изображают в виде зависимости KC/I_θ от сложного аргумента $\sin^2(\theta/2 + qC)$, где I_θ — приведенная интенсивность рассеяния света, равная $(I_1 - I_2) \cdot \frac{\sin \theta}{1 + \cos^2 \theta}$ (I_1, I_2 — интенсивность рассеяния света раствора и растворителя соответственно); C — концентрация раствора, q — постоянная величина, выбранная для удобства построения графика таким образом, чтобы $qC_{\max}$ имело порядок нескольких единиц. Коэффициент K — постоянная величина для данной системы полимер — растворитель, равная

$$K = \frac{2\pi^2 n_0^2}{\lambda_0^4 N_A R_0} \left(\frac{dn}{dC} \right)^2 I_{0,90^\circ},$$

где n_0 — показатель преломления бензола (1,4964), $\lambda_0 = 5,46 \cdot 10^{-5}$ см, N_A — число Авогадро, R_0 — константа Релея для бензол-эталона, $16,3 \cdot 10^{-6}$ для $\lambda = 5,46 \cdot 10^{-5}$ см, dn/dC — инкремент показателя преломления, определяемый экспериментально (0,141), $I_{0,90^\circ}$ — интенсивность рассеяния света бензол-эталонном при $\theta = 90^\circ$.

Затем проводили экстраполяцию к $C = 0$ для всех измерений интенсивности рассеяния при каждом из углов θ и к $\theta = 0$ для всех измерений при каждой из концентраций C . Полученные данные представлены на рис. 1. Начальная ордината $A_0 = (CK/I_\theta)_{C=0}$, получающаяся как точка пересечения двух экстраполяционных кривых ($C = 0$ и $\theta = 0$), определяет истинное значение молекулярного веса (M)

$$M = (CK/I_\theta)_{C=0}^{-1} = 1/A_0;$$

$$M = 22,7 \cdot 10^6.$$

Исследование высокомолекулярной фракции с помощью электронной микроскопии выявило в ней наличие двух типов частиц: частицы разме-

ром $140 \times 250 \text{ \AA} - 500 \times 650 \text{ \AA}$ и комплексы размером $240 \times 780 \text{ \AA} - 340 \times 1200 \text{ \AA}$.

Полученные данные говорят о весьма значительных размерах макромолекул эндотоксинов, обладающих высокой биологической активностью. Наши данные несколько отличаются от приводимых в литературе значений молекулярного веса, определенных для других видов эндотоксинов методом светорассеяния.

По данным Триподи (⁵), эндотоксин *Serratia marcescens* имеет молекулярный вес $6 \cdot 10^6$; по данным Дежелик (⁷), эндотоксин *Salmonella typhi* имеет молекулярный вес $9 \cdot 10^6$. Однако очистка, проведенная этими авторами, не предусматривала удаление веществ с меньшим, но близким молекулярным весом, и поэтому могли быть получены весьма усредненные и более низкие значения молекулярного веса. Кроме того, используемый в работе Триподи растворитель далеко не идеален (о чем свидетельствует отрицательный второй вириальный коэффициент), и поведение в нем молекул исследуемого эндотоксина отличается от естественных условий (молекула сжата), что несомненно сказалось и на данных рассеяния. И, наконец, на полученных результатах также мог сказаться объект исследования (вид микроорганизма) и, особенно, метод выделения эндотоксина, от которого зависит количественное содержание в препарате собственно эндотоксина. Однако, несмотря на указанные различия в численном выражении молекулярного веса, бесспорно, что эндотоксины грам-отрицательных бактерий, обладающие высокой биологической активностью, имеют весьма высокий молекулярный вес и размеры молекул. Наличие характерного комплекса биологических свойств и высокий уровень проявляемой активности позволяют рассматривать их в качестве нативных фрагментов оболочки микробной клетки.

Выражаем глубокую благодарность В. М. Купнареву за помощь при проведении электронно-микроскопических исследований.

Ленинградский научно-исследовательский институт вакцин и сывороток

Поступило
9 I 1973

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ Н. И. Шапиро, Т. Г. Васильева и др., Журн. микробиол., 10, 55 (1971). Сообщ. 1.
- ² Н. И. Шапиро, Т. Г. Васильева и др., Журн. микробиол., 11, 35 (1971). Сообщ. II.
- ³ Т. Г. Васильева, Р. А. Андриевская и др., Химические вакцины и вакцинация против кишечных инфекций. Тез. докл. Всесоюз. межinst. научн. конф., Л., 1972, стр. 22.
- ⁴ Т. Г. Васильева, ДАН, 184, № 1, 225 (1968).
- ⁵ D. Tripodi, A. Nowotny, Ann. N. Y. Acad. Sci., 133, 604 (1965).
- ⁶ D. Tarmina, K. Milner et al., J. Bacteriol., 96, 1611 (1968).
- ⁷ N. Deželic, B. Pendl, Gj. Deželic, Biochim. et biophys. acta, 112, 589 (1966).
- ⁸ H. Raistrick, W. W. Topley, Brit. J. Exp. Pathol., 15, 113 (1934).
- ⁹ Т. Г. Васильева, Н. И. Шапиро и др., В кн. Химические тифо-паратифозные вакцины и иммунологические препараты, Л., 1970, стр. 35.
- ¹⁰ В. Н. Цветков, В. Е. Эскин, С. Я. Френкель, Структура макромолекул в растворах, «Наука», 1964.
- ¹¹ Гликопротеины, 1, Под ред. А. Готтшалка, М., 1969.
- ¹² Ч. Тенфорд, Физическая химия полимеров, М., 1965.

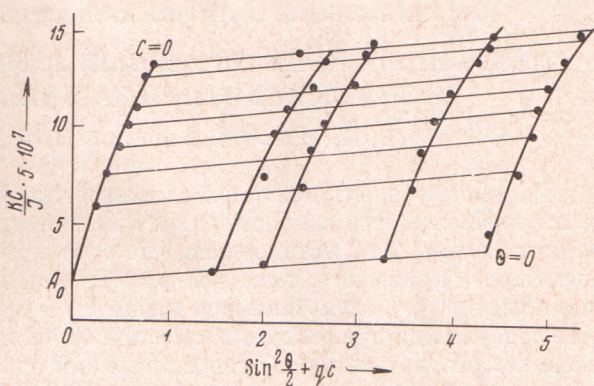


Рис. 1. График Зимма для определения молекулярного веса высокоактивного крупномолекулярного компонента эндотоксинов *S. paratyphi* B.