

เอนโดท็อกซิน ของ ซูโดโมแนส แอรูจิโนซ่า



นางสาว นวลจันทร์ เจริญกุล

004239

วิทยานิพนธ์นี้ เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา ภาสัชศาสตรมหาบัณฑิต

ภาควิชาจุลชีววิทยา

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พ.ศ. ๒๕๒๕

ISBN 974 - 560 - 677 - 4

I 15919390

ENDOTOXIN OF PSEUDOMONAS AERUGINOSA

MISS NUALCHAN CHAROENKUL

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science in Pharmacy

Department of Microbiology

Graduate School

Chulalongkorn University

1982

Thesis Title            Endotoxin of Pseudomonas aeruginosa  
By                        Miss Nualchan Charoenkul  
Department            Microbiology  
Thesis Advisors       Assistant Professor Santi Thoongsuwan Ph.D.  
                             Assistant Professor Aurapin Rudeechuen

---

Accepted by the Graduate School, Chulalongkorn University  
in partial fulfillment of the requirements for the Master's degree.

*S. Bunnag*  
..... Dean of Graduate School  
(Associate Professor Supradit Bunnag, Ph.D.)

Thesis Committee

*Saree Virunhaphol*  
..... Chairman  
(Assistant Professor Saree Virunhaphol)

*Santi Thoongsuwan*  
..... Member  
(Assistant Professor Santi Thoongsuwan, Ph.D.)

*Usana Hongvareewat*  
..... Member  
(Assistant Professor Usana Hongvareewat)

..... Member  
(Assistant Professor Aurapin Rudeechuen)

(Copyright of the Graduate School, Chulalongkorn University)

หัวข้อวิทยานิพนธ์

ชื่อ

อาจารย์ที่ปรึกษา

ภาควิชา

ปีการศึกษา

เอนโดท็อกซิน ของ ซูโคโมแนส แอรูจิโนซ่า

นางสาว นวลจันทร์ เจริญกุล

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สันติ อุงสุวรรณ

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ อรพิน ฤดีชื่น

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

๒๕๒๘

บทคัดย่อ



เอนโดท็อกซินของเชื้อ Pseudomonas aeruginosa สามารถที่จะแยกและทำให้เข้มข้นได้ โดยการตกตะกอนด้วย ammonium sulfate และทำให้บริสุทธิ์เพียงบางส่วนได้โดยการ ใช้ Sephadex G - 200 Column Chromatography หลังจากทำให้เข้มข้นแล้ว ผลิตภัณฑ์ที่เตรียมได้เป็นโปรตีน ซึ่งในขนาด 130 micrograms ทำให้หนูถีบจักรตาย ๕๐ % สิ่งเตรียมนี้สามารถกระตุ้นให้เกิด antibodies ซึ่งเห็นได้จาก optical density profile และสนับสนุนด้วยผลจากการทำ gel diffusion test

พยาธิสภาพของเนื้อเยื่อของหนูถีบจักรที่ถูกฉีดเอนโดท็อกซินเข้าที่ช่องท้อง แสดงให้เห็นชัดเจนถึงการเปลี่ยนแปลงภายในเซลล์ของตับ ไต และม้าม ลักษณะผิดปกติที่พบในอวัยวะเหล่านี้คือ cellular swelling และการเพิ่มของ fatty acid granules ภายในเซลล์ โดยการตรวจ direct immunofluorescent antibody technique แสดงให้เห็นการกระจายของจุดเรืองแสงของเซลล์อวัยวะเหล่านี้

327.86 micrograms ของ immune globulin ที่เตรียมจาก crude endotoxin สามารถที่จะใช้ยับยั้งพิษของเอนโดท็อกซินของเชื้อ P. aeruginosa ในสองขนาดที่ทำให้หนูถีบจักรตาย ๕๐ % อย่างได้ผล

Thesis Title                      Endotoxin of Pseudomonas aeruginosa  
Name                                      Miss Nualchan Charoenkul  
Thesis Advisor                      Assistant Professor Santi Thoongsuwan Ph.D  
                                                 Assistant Professor Aurapin Rudeechuen  
Department                              Microbiology  
Academic Year                              1981



ABSTRACT

Endotoxin of Pseudomonas aeruginosa could be separated and concentrated by precipitation with ammonium sulfate and partially purified by Sephadex G - 200 column chromatography, after concentration the final product which was protein whose one LD<sub>50</sub> was 130 mcg. for mouse. The preparation could stimulate immune response as shown in optical density profile and confirmed by gel diffusion test.

The histopathology of mice inoculated intraperitoneally with endotoxin were markedly demonstrated by histo-microscopic changes in the liver, kidney and spleen cells. The abnormalities of these organs were characterized by cellular swelling and increasing of fatty acid granules. Direct immunofluorescent antibody technique demonstrated the distribution of spotty fluorescence in the region of these organs.

327.87 mcg. of immune globulin prepared from crude toxin was effectively used to neutralize two doses of mouse LD<sub>50</sub> of P. aeruginosa endotoxin per mouse.



#### ACKNOWLEDGEMENT

I wish to express my appreciation to Assistant Professor Dr. Santi Thoongsuwan, Head of the Department of Microbiology, the Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University, for his helpful guidance, suggestions, criticisms and encouragement throughout the course of this study.

My sincere gratitude and thanks to Assistant Professor Aurapin Rudeechuen the Instructor, the Department of Microbiology for her kindness.

I should also like to extend my deep gratitude to Dr. Petcharin Srivatanakul and Miss Sunanta Chariyalertsak National Cancer Institute and Dr. Mario Riganti Department of Clinical and Hospital of Tropical Medicine, Faculty of Tropical Medicine, Mahidol University, for their kind cooperation in allowing me to use some of the equipments in their Departments.

I am mostly thankful to Associate Professor Dr. Pimpan Leanphibul, Head of the Department of Microbiology, Assistant Professor Supanee Santivijai, Department of Microbiology, Medical Technology, Mahidol University, and Miss Mayuna Srisuphanunt, Department of Immuno - serology the Institute of Dermatology, for granting me the opportunity to carry out some parts of this work.

I also wish to extend my sincere thanks to all of those whose names have not been mentioned and to those who in one way or another helped me to make this work a reality.

Finally, I am deeply obliged to the Chulalongkorn University Graduate School, for granting me part of the financial support to conduct this project.

CONTENTS

	Page
ABSTRACT (Thai) .....	IV
ABSTRACT (English) .....	V
ACKNOWLEDGEMENTS .....	VI
TABLES .....	IX
FIGURES .....	X
ABBREVIATIONS .....	XII
CHAPTER .....	-
I    INTRODUCTION .....	1
II   MATERIALS AND METHODS .....	18
III  RESULTS .....	32
IV   DISCUSSION .....	51
V    CONCLUSION .....	54
REFERENCES .....	56
VITA .....	65





TABLES

TABLE	Page
1. Biological activities of lipopolysaccharide endotoxin .....	15
2. Shwartzman phenomena produced by cell - wall protein A, original endotoxin protein and the lipopolysaccharide of component I .....	16
3. The protein content of peaks 1, 2, 3 and 4 were tested for the toxicity .....	35
4. Estimation of LD50 per mouse of <u>Pseudomonas</u> <u>aeruginosa</u> endotoxin .....	36
5. The in vitro and in vivo testing of endotoxin neutralization .....	50

FIGURES

FIGURE	Page
1. Diagram of the structure of Lipopolysaccharide .....	17
2. The optical density at 280 nm. of gel fractionation of <u>Pseudomonas aeruginosa</u> endotoxin .....	34
3. Liver sections	
A. Normal mouse liver .....	37
B. <u>Pseudomonas aeruginosa</u> endotoxin treated mouse liver .....	38
4. Kidney sections	
A. Normal mouse kidney .....	40
B. <u>Pseudomonas aeruginosa</u> endotoxin treated mouse kidney .....	41
5. Spleen sections	
A. Normal mouse spleen .....	42
B. <u>Pseudomonas aeruginosa</u> endotoxin treated mouse spleen : Showed magakaryocytes, lymphocytolysis and phagocytosis .....	43
C. <u>Pseudomonas aeruginosa</u> endotoxin treated mouse spleen : Showed an increase in number of megakaryocytes .....	44
D. <u>Pseudomonas aeruginosa</u> endotoxin treated mouse spleen : Showed lymphocytolysis and active phagocytosis .....	45

FIGURE	Page
6. Double immunodiffusion test in gel of <u>Pseudomonas aeruginosa</u> crude endotoxin against rabbit immune globulin .....	47
7. Immunofluorescence of endotoxin treated mouse kidney .....	48
8. Immunofluorescence of endotoxin treated mouse spleen .....	49

ABBREVIATIONS

AP	Alternative pathways
C	Centrigrade
cm	Centimeter
cm <sup>2</sup>	Square centimeter
CP	Classical pathways
GPS	Guinea pig serum
g	Gram
H & E	Hematoxylin and Eosin
KDO	2 - keto - 3 - deoxyoctonic acid
Kg	Kilograms
LD <sub>50</sub>	50 % lethal dose
LPS	Lipopolysaccharide
$\mu$	Microns
mcg	Micrograms
mg	Milligrams
ml	Millilitre
mm	Millimeter
M	Molar
nm	Nanometer
N	Normality
NSS	Normal salin solution

OD	Optical density
OEP	Original endotoxin protein
PBS	Phosphate buffered saline
rpm	Revolutions per minute
v/v	Volume by volume