

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«БАШКИРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

Медико-профилактический факультет с отделением биологии
Кафедра фундаментальной и прикладной микробиологии

На правах рукописи



Миронов Никита Константинович

РАЗРАБОТКА МЕТОДИЧЕСКИХ ПОДХОДОВ К ОПРЕДЕЛЕНИЮ
СОДЕРЖАНИЯ ЛИПОПОЛИСАХАРИДОВ В КЛЕТЧНОЙ СТЕНКЕ
БАКТЕРИАЛЬНОЙ КЛЕТКИ

Научный руководитель:

зав. кафедрой ФПМ, д.м.н, профессор



А.Р. Мавзютов

зав. лабораторией физико-химических
методов анализа биополимеров
ИБГ УФИЦ РАН, к.б.н.

Р.Р. Гарафутдинов

Уфа – 2021

ОГЛАВЛЕНИЕ

Список сокращений и условных обозначений	3
ВВЕДЕНИЕ	4
Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	7
1.1. Химическая природа и молекулярная структура липополисахаридов	7
1.1.1. О-полисахаридная цепь	8
1.1.2. Олигосахаридный кор	10
1.1.3. Липид А	12
1.2. Негативные эффекты липополисахаридов	13
1.3. Иммуностимулирующие эффекты липополисахаридов	15
1.4. Методы выделения липополисахаридов из клеточных стенок бактерий	17
Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	23
2.1. Объекты исследования	23
2.2. Приготовление селективных и дифференциально-диагностических питательных сред	23
2.3. Посев музейной культуры <i>Escherichia coli</i> на жидкую питательную среду	24
2.4. Условия культивирования микроорганизмов	25
2.5. Центрифугирование жидкой культуры для получения микробной массы	25
2.6. Приготовление рабочих растворов	26
Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ	27
3.1. Экстракция липополисахаридов из клеточных стенок бактериальных клеток	27
3.2. Выделение липополисахаридов с помощью колоночной хроматографии	32
3.2. Подтверждение состава липополисахаридов	33
ВЫВОДЫ	36
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	37

Список сокращений и условных обозначений

ГОб - грамотрицательные бактерии

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

КДО - 2-кето-3-дезоксид-D-манно-октоновая кислота

ЛПС - липополисахариды

О-ПС - О-полисахаридная цепь

ПААГ - полиакриламидный гель

РНК – рибонуклеиновая кислота

ЯМР – спектроскопия - спектроскопия ядерного магнитного резонанса

EDTA - этилендиаминтетрауксусная кислота

LB-среда - бульон Лурия-Бертани (по Миллеру)

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность исследования. На сегодняшний день проблемы инфекционной патологии не потеряли своей актуальности, поскольку до сих пор являются причиной трети общего ежегодного количества смертей в мире. Прогрессирующий рост числа инфекционных заболеваний, возбудителями которых являются условно-патогенные грамотрицательные бактерии (ГОб) из семейства *Enterobacteriaceae*, также не имеет положительных тенденций, потому что в настоящее время большинство клинических штаммов ГОб являются мультирезистентными и, как следствие, вызванные ими нозокомиальные инфекции плохо поддаются лечению (Бондаренко, 2007; Варбанец 2002). Стоит отметить, что ГОб все также принадлежит ведущая роль в развитии гнойно-септической инфекции, причем из года в год наблюдается устойчивая тенденция к возрастанию числа смертельных исходов, что, в свою очередь, представляет серьезную социально-экономическую проблему (Козлов, Голуб, 20011; Титов, 2003).

Ключевым фактором патогенности ГОб считается липополисахарид (ЛПС) – неизменный структурный компонент клеточной стенки ГОб, биологические эффекты которого реализуются в результате лизиса бактериальных клеток. ЛПС преимущественно известны как индукторы системных воспалительных реакций, обладают широкой биологической активностью, являясь, например, эндотоксинами, соматическими антигенами и специфическими рецепторами бактериофагов (Oral, 2003; Варбанец, 2006; Oral, 2010).

На фоне массового и бесконтрольного приема антибактериальных, противогрибковых, противовирусных и других химиотерапевтических препаратов наблюдается ярко выраженное снижение иммунореактивности организма и, соответственно, снижение его защитных свойств. В связи с этим резко возрос интерес современной медицинской и биологической

наук в разработке и применении препаратов, воздействующих на иммунитет больных с заболеваниями, которые характеризуются вялым, рецидивирующим течением с устойчивостью к адекватной этиотропной терапии. В клинической практике для восстановления иммунитета после перенесенного хронического заболевания любой этиологии принято использовать иммуномодуляторы, которые широко представлены на фармацевтическом рынке в России, однако, конкретно иммунокорректоров бактериального происхождения в разработке не так много и применяются они достаточно редко, несмотря на то, что их эффективность все чаще обсуждается и научно доказывается (Boroni Moreira, 2012; Niederbichler et.al, 2011). Именно поэтому совершенствование методик получения фракций ЛПС в достаточном количестве весьма актуально и необходимо как для изучения ЛПС-обусловленных биологических эффектов, так и для разработки новых подходов к иммунотерапии.

Цель исследования. Разработка эффективного метода получения высокоочищенного препарата ЛПС из клеточной стенки бактериальной клетки.

Задачи исследования

1. Проведение анализа существующих методов экстракции ЛПС из бактериальной клетки.
2. Оптимизация условий проведения процедуры выделения высокоочищенного препарата ЛПС из клеточной стенки грамотрицательных бактерий на примере *Escherichia coli*.
3. Проведение анализа фракций элюатов ЛПС с помощью ЯМР-спектроскопии для выбора наиболее лучшей методики экстракции ЛПС и оценки её эффективности и степени производительности.

Практическая значимость.

Разработан высокоэффективный и высокопроизводительный метод получения чистого препарата ЛПС из клеточной стенки *E. coli*, освобожденного от большей части контаминирующих высокомолекулярных органических соединений.

Область применения результатов исследования.

Новый метод выделения препаратов ЛПС из клеточной стенки бактериальных клеток в перспективе может быть использован для получения субстанций ЛПС и/или его фракций в достаточном количестве для производства иммуномодулирующих препаратов, имеющих ряд преимуществ над синтетическими и полусинтетическими препаратами.

ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Химическая природа и молекулярная структура липополисахаридов

Подробное изучение химической природы, молекулярной организации, иммунохимических свойств и функциональной активности ЛПС началось в первой половине 50-х годов XX века. Начало было положено научной группой О. Вестфаля (O. Westphal), которая разработала водно-фенольный метод для экстракции высокоочищенных препаратов ЛПС, а также выполнила ряд своих классических работ по биохимии ЛПС (Кабанов, Прохоренко, 2011; Кочинкова, Лэм, 2011).

На сегодняшний день достоверно установлено, что ЛПС относятся к основным структурным компонентам внешней мембраны клеточной стенки всех ГОБ, причем представлены они в достаточно большом количестве – на одну клетку *Escherichia coli* приходится в среднем $3,5 \times 10^6$ молекул ЛПС, образующих упорядоченный монослой, участвующий в формировании зоны первичных контактов между микроорганизмом и внеклеточными факторами. Такой высокоупорядоченный монослой выполняет большое количество физиологически важных функций бактериальной мембраны, помимо этого служит эффективным защитным барьером от действия детергентов и антибактериальных препаратов и способствует «ускользанию» бактерий от воздействия природных защитных факторов организма-хозяина (Opal, 2007; Rachoïn, 2010; Кабанов, 2010).

ЛПС состоит из нескольких консервативных блоков (рисунок 1):

- 1) О-антиген (O-antigen region) - последовательности одинаковых олигосахаридов, предопределяющие видовые и серологические особенности бактерии,
- 2) олигосахарид сердцевины (core oligosaccharide) - высокомолекулярное соединение с характерной консервативной

структурой (внутренний слой – гептоза (3-дезоксид-D-манно-2-октулосоновая кислота), внешний слой – гексоза),

- 3) липид А (lipid A) – самая консервативная часть ЛПС, определяющая биологические свойства соответствующей бактерии.

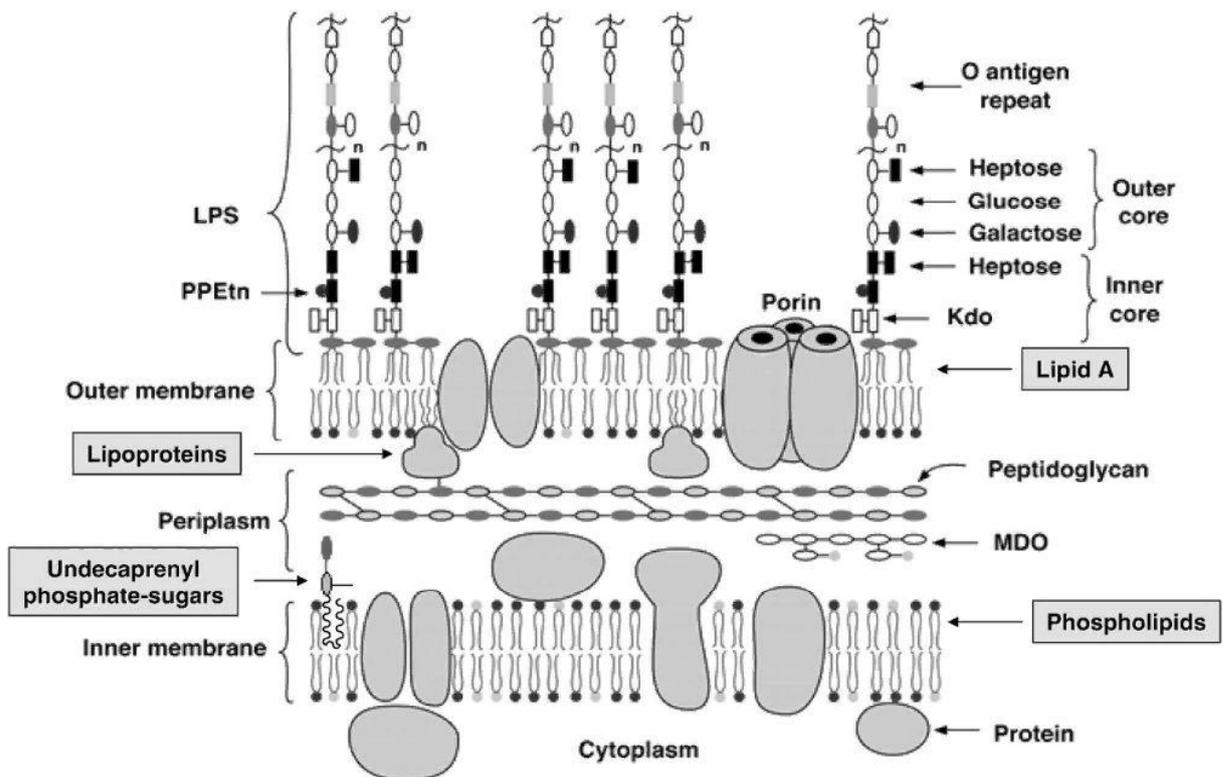


Рисунок 1 - Молекулярная модель внутренней и внешней мембран *Escherichia. coli* K-12 (Giske., 2008).

1.1.1. O-полисахаридная цепь

O-полисахаридная цепь (O-ПС) – разнообразная по своему качественному составу и структурной организации структура в молекулах ЛПС, несущая нейтральный или небольшой отрицательный заряд и представленная линейным или разветвленным гетерополисахаридом, построенным из повторяющихся олигосахаридных звеньев различной

длины. Моносахариды могут включать достаточно широкий спектр структурных звеньев:

- гексозы (галактоза, глюкоза, манноза);
- 6-дезоксигексозы (фукоза, рамноза, 6-дезокситалоза);
- 3,6-дезоксигексозы (абеквоза, тивелоза, аскарилоза, паратоза);
- пентозы (рибоза, ксилоза);
- 2-амино-2-дезоксигексозы (глюкозамин, галактозамин, маннозамин);
- 2-амино-2,6-дидезоксигексозы (хиновозамин, фукозамин, рамнозамин и др.);
- 3-амино-3,6-дидезоксигексозы;
- 4-амино-4,6-дидезоксигексозы и т.д.

Наиболее часто встречающиеся моносахариды в составе О-ПС - галактоза и глюкоза, чуть реже - рибоза, D-ксилоза, 3-O-метил-D-ксилоза и D-аллоза (Варбанец, 2006; Кабанов, 2010).

Специфические антигенные детерминанты, определяющие внутри- и межвидовую серологическую специфичность ЛПС ГОБ, обусловлены природой, последовательностью, аномерной конфигурацией, типом связей и характером замещения индивидуальных моносахаридных остатков внутри повторяющихся олигосахаридных звеньев. Также причиной гетерогенности штаммов ГОБ может служить разная длина цепи О-ПС, которая варьирует в достаточно широких пределах и может быть наглядно продемонстрирована с помощью электрофореза в полиакриламидном геле (ПААГ) в присутствии додецилсульфата натрия. Фракционирование и специфическое окрашивание ПААГ серебром позволяет получить характерную картину «лесенки», характеризующейся серией полос с различной интенсивностью окраски. Нижняя часть электрофореграммы - подвижные молекулы ЛПС, содержащие только комплекс «олигосахаридный кор + липид А», средняя часть – ЛПС, содержащие

короткие О-ПС, верхняя часть (наиболее низкая степень подвижности молекул ЛПС) - ЛПС, содержащие длинные О-ПС (Brandenburg, Seydel, 2009).

Опубликованы научные сведения, подтверждающие тот факт, что гетерогенность препаратов ЛПС, обусловленная О-ПС разной длины, предопределяется условиями культивирования бактерий, а также методикой выделения ЛПС из бактериальной клетки. К примеру, препараты ЛПС, полученные водно-фенольным экстрагированием, в большинстве случаев содержат молекулы с длинными О-ПС, в то время как экстракция с использованием этилендиаминтетрауксусной кислоты (EDTA) позволяет выделять препараты ЛПС с превалирующим количеством О-ПС короткой длины (Brandenburg, Schromm, Gutschmann, 2010). Стоит также отметить, что доля молекул с длинными О-ПС предопределяет серологическую активность, а также характер взаимодействия с протективными антителами. Именно поэтому знание гетерогенности молекулы ЛПС весьма значимо и информативно.

1.1.2. Олигосахаридный кор

Олигосахаридный кор - функционально важная часть молекулы ЛПС, присутствующая у всех изученных на сегодняшний день видов ГОБ и представляющая собой кислый олигосахарид, связанный с липидом А путем кислотолабильной α -гликозидной связи остатком 2-кето-3-дезоксид-манно-октоновой кислоты (КДО), находящейся на восстанавливающем конце внутренней области кора. Избирательное разрушение данной связи посредством кислотного гидролиза лежит в основе метода разделения ЛПС на липид А, который нерастворим в водном растворе, а также водорастворимую углеводную часть, представленную деградированным полисахаридом, включающим в себя гетерогенный набор О-ПС различной

длины, присоединенных к олигосахаридному кору) (Chapman, Iredell, 2008)..

Олигосахаридный кор является достаточно консервативной частью молекулы ЛПС в отличие от О-ПС, которые отличаются своей вариабельностью. Структура кора даже среди разных видов ГОБ одного семейства *Enterobacteriaceae* имеет высокую степень гомологии. В строении кора энтеробактерий принято различать две области:

- внутренняя область – непосредственно связана с липидом А, состоит преимущественно из остатков L-глицеро-D-манно-гептозы и КДО, полярные заместители представлены фосфатом, пирофосфатом и этаноламином, присоединенным фосфодиэфирной или дифосфодиэфирной связью;
- внешняя область – наиболее сильно удалена от липида А, состоит преимущественно из D-глюкозы, D-галактозы, N-ацетил-D-глюкозамина, N-ацетил-D-галактозамина, D-галактуроновой кислоты и ряд других моносахаридов.

Причина гетерогенности внутренней области кора – это нестехиометрическое гликозилирование терминального остатка КДО или же гексозного фрагмента (например, моносахаридами), а также нестехиометрическое присоединение к КДО или гексозе фосфатсодержащих заместителей (2-аминоэтанолфосфата, 2-аминоэтилпирофосфата и др.) (Kabanov, Prokhorenko, 2010; Kagan, 2017).

В отличие от внутренней области кора внешняя область более вариабельна и, к примеру, у бактерий рода *Salmonella* представляет собой разветвленный пентасахарид, который в составе имеет два остатка D-глюкозы, два остатка D-галактозы и один остаток N-ацетил-D-галактозамина (Ra-кор). Для вида *Escherichia coli* описано пять структурных типов внешней области кора: R1, R2, R3, R4 и R5. По структуре они достаточно сильно схожи с Ra-ором бактерии рода

Salmonella, однако главная объединяющая их особенность - трисахаридный фрагмент α -D-Hex-(1,2)- α -D-Hex-(1,2)- α -D-Glc, в котором Hex (гексоза) может быть глюкозой или галактозой.

Следует также отметить, что ввиду широкого распространения мультирезистентных штаммов ГОБ, являющихся чаще всего основной причиной развития нозокомиальных инфекций, внутренняя область кора и КДО рассматривается как основная мишень для действия антибактериальных препаратов нового поколения, а также иных фармакологических препаратов, в том числе моноклональных антител (Cross, 2014).

1.1.3. Липид А

Липид А – сложно организованная молекулярная структура, определяющая биологические свойства бактериальной клетки и представляющая собой фосфорилированный дисахарид, построенный из двух остатков глюкозамина и остатков жирных кислот, которые присоединены по гидроксильным группам и аминогруппам (Sato, 2008; Brandenburg, Wiese, 2011). Остатки жирных кислот располагаются по одну сторону дисахаридной основы липида А и ориентированы перпендикулярно внешней мембране, таким образом гидрофобное взаимодействие с внутренним фосфолипидным бислоем плазматической мембраны фиксирует молекулы ЛПС на поверхности бактериальной клетки в виде компактного наружного остова, который служит высокоупорядоченным барьером для крупных гидрофобных молекул (желчных кислот, детергентов и липофильных антибиотиков).

В формообразовании и поддержании целостности бактериальной клетки также немало важное значение имеет комплекс липида А с белками-поринами (Omp F, Omp C), которые вместе образуют защитную гексагональную решетчатую матрицу (Brandtzaeg, 2010), а также создают

оптимальные условия для фолдинга и стабилизации активной конформации мембранных белков. Липид А большинства бактерий семейства *Enterobacteriaceae* имеет структуру I-го типа:

- гидрофильная основа - дисахарид β -D-глюкозаминил-(1 \rightarrow 6)-D-глюкозамин, построенный из двух β -1,6-связанных остатков D-глюкозамина (GlcNII(β 1,6)GlcNI), фосфорилированного в положение 1 остатка GlcNI и в положение 4' остатка GlcNII;
- количество остатков жирных кислот гидрофобной части липида А - от 5 до 7;
- полярные заместители - присоединенные одна или две дополнительные фосфатные группы, образующие пиррофосфат, этаноламин или этаноламинфосфат (с характерным формированием диэфира фосфорной или пиррофосфорной кислоты), а также некоторые моносахариды - 4-амино-4-дезоксид-L-арабинозу, D-глюкозамин, D-арабинофуранозу.

Предполагается, что гетерогенность липида А в молекулах ЛПС ГОБ имеет преимущественно адаптационный характер. В частности, было установлено, что условия культивирования микроорганизмов (t, °C, ионный состав и pH среды) действительно определяют жирнокислотный состав липида А и содержание полярных заместителей фосфатных групп (Das, Kumar Swain, 2014).

1.2. Негативные эффекты липополисахаридов

Липополисахариды ГОБ - это высококонсервативные активаторы (лиганды) микроорганизмов, которые распознаются системой врожденного иммунитета и взаимодействуют с сигнальными рецепторами на клетках иммунной системы макроорганизма. Результатом такого взаимодействия является экспрессия цитокинов и, как следствие, цитокинемия,

усиливающая системную реакцию при воспалении (Charalambous, 2007; Cross, 2010).

Общеизвестным остается тот факт, что результатом негативного действия ЛПС на макроорганизм является сепсис и септический шок. Однако, на сегодняшний день имеется достаточно много научно подтвержденной информации о влиянии ЛПС ГОБ, а точнее его избыточного количества в результате бактериальной транслокации, на течение ряда заболеваний человека (Вышегуров, 2006; Аниховская, 2006; Sacata, 2010, Li, 2017). Бактериальную транслокацию можно охарактеризовать как перемещение кишечной микрофлоры и продуктов ее жизнедеятельности, в том числе ЛПС, из просвета ЖКТ в лимфоидную ткань, внутренние органы и кровь. Основная причина проникновения бактерий и молекулярных продуктов - нарушение барьерных функций стенки кишечника. Даже у практически здоровых людей все равно может иметься небольшое количество ЛПС в крови, тканях или органах (например, в результате бактериальной транслокации в крови портальной вены концентрация ЛПС может достигать от 0,01 до 1 нг/мл) (Вышеугоров, 2007; Buttenschoen, 2010; Rajili-Stojanovi, 2013).

Избыток ЛПС в системном кровотоке, а также недостаточность антиэндотоксинового иммунитета определяют патологические состояния, которые могут трансформироваться в те или иные заболевания ввиду наличия генетической и приобретенной предрасположенности.

Примеры таких нозологических заболеваний:

- ДВС-синдром,
- антифосфолипидный синдром,
- атеросклероз,
- патология беременности и ранних этапов постнатального развития,
- патология сердечно-сосудистой системы,
- бронхиальная астма,

- хроническая вирусная инфекция,
- послеоперационные осложнения,
- патологии глаз и др. (Мешков, 2005; Иванов, Крапивина, 2007; О कोरोков, 2011; Конев, Лазебник, 2011; Хасанова, 2011).

Эндотоксиновая агрессия характеризуется острым или хроническим течением с наличием клинических проявлений: повышение температуры тела, лейкоцитоз или лейкопения, проявления гипер- или гипокоагуляции, активация процессов свободно-радикального окисления, а также дисбаланс показателей, характеризующих состояние антиэндотоксинового иммунитета.

Предрасполагающие факторы повышения концентрации ЛПС в крови с последующим развитием эндотоксиновой агрессии:

- недостаточная функциональная активность кишечного и/или печеночного барьеров;
- стрессовые состояния различного генеза, обуславливающие дополнительный сброс портальной крови в общую гемоциркуляцию, минуя при этом печень,
- любые патологии, сопровождающиеся шунтированием портального кровотока, портальной гипертензией, трофическими нарушениями слизистой оболочки кишечника и патологией печени.

1.3. Иммуностимулирующие эффекты липополисахаридов

Рост числа инфекционных заболеваний бактериальной этиологии стал достаточно сильным толчком для стремительного снижения иммунологической реактивности организма человека и, как следствие, нарушения соотношения и функциональной активности клеток иммунной системы человека. Результатом таких изменений стало развитие иммунодефицитов - заболеваний системы иммунитета (Buttenschoen, 2010;

Boutagy, 2016). Лечение таких нарушений иммунной системы достаточно трудоемко и может проводиться с использованием иммуотропных препаратов, которые принято разделять на 3 группы: иммуномодуляторы, иммуностимуляторы, и иммунодепрессанты.

Иммуномодуляторы принято классифицировать на экзогенные, эндогенные и химически чистые. Нас больше интересуют экзогенные иммуномодуляторы, поскольку их основными представителями являются лекарственные препараты микробного происхождения, которые между собой можно условно разделить на 3 поколения. Препараты, представляющие собой липополисахариды бактериального происхождения, относят преимущественно в группу препаратов I поколения (например, Продигиозан - липополисахарид, выделенный из микроорганизма *Bacillus prodigiosum*, в настоящее время в лечебной практике не применяется; Пирогенал – липополисахаридный комплекс, выделенный из клеток *Salmonella typhi*).

Иммуномодуляторы бактериального происхождения обладают десенсибилизирующим и противовоспалительным действием, повышают как общую, так и специфическую резистентность макроорганизма, воздействуют на работу клеточного и гуморального иммунитета, а также влияют на терморегулирующие центры гипоталамуса. Препараты ЛПС бактериальных клеток участвуют в усилении фагоцитарной активности макрофагов (Bosshart, Heinzelmann, 2007) путем влияния на рецепторы мембраны макрофагов, резко усиливая их секреторную активность и обуславливая тем самым стимуляцию макрофагального эндоцитоза. Также препараты ЛПС принимают участие в усилении фагоцитоза, стимуляции продукции интерлейкина-1 (IL-1), вызывающего пролиферацию целого ряда клеток организма, интерлейкина-2 (IL-2) (Balistreri, 2011), необходимого для поддержания роста лимфоцитов, фактора некроза опухоли (ФНО), индукции эндогенного интерферона, а также продукции активных форм кислорода (Bohm, 2010)

На сегодняшний день становится все больше научных доказательств о том, что ЛПС является достаточно удобным инструментом для эффективной коррекции нарушений иммунных состояний человека, поскольку именно они участвуют в формировании специфического иммунного ответа хозяина в ответ на проникновение чужеродного агента.

1.4. Методы выделения липополисахаридов из клеточных стенок бактерий

Одним из путей более подробного анализа роли ЛПС в развитии различных инфекционных заболеваний макроорганизма является выяснение химической природы, молекулярной организации и иммунохимических свойств ЛПС. Для подобных исследований существует достаточное количество методов, направленных на экстракцию ЛПС из клеточной стенки бактерий и, как следствие, получение чистого препарата. Наиболее известным методом, послужившим основой для большинства других методик, является водно-фенольный способ получения ЛПС (Вестфаль, Янн, 1967). Метод включает следующие этапы:

- I. обработка микробной массы водно-фенольной смесью при 65°C в течение 45 мин.;
- II. охлаждение смеси и разделение центрифугированием;
- III. диализ водной фазы в течение 3-4 суток против дистиллированной воды для удаления фенола;
- IV. осаждение ЛПС ультрацентрифугированием при 100 000 g, 15°C и в течение 3 ч.

Известен способ выделения биологически активной фракции, содержащей S-ЛПС из ГОБ (Апарин и др., 2005). Метод условно можно разделить на 4 этапа:

- I. экстракция суспензии (содержит бактериальные клетки, продукты их жизнедеятельности, лизаты) горячим водным фенолом по Вестфалю, диализ, отделение нерастворимого материала и лиофилизация;
- II. ферментативная очистка (рибонуклеаза, дезоксирибонуклеаза, протеиназа К) промежуточного продукта от примесей высокомолекулярных соединений (белки, нуклеиновые кислоты), диализ, лиофилизация;
- III. ультрацентрифугирование промежуточного продукта фракционирование путем экстракции смесью хлороформ - метанол - водный HCl 1:1:0,4-0,5, затем на выбор или же использование в комплексе других методов (гель-электрофорез в ПААГ, колоночная хроматография, гель-проникающая хроматография, ультрафильтрация);
- IV. диализ, гель-хроматография и получение готового конечного продукта.

Также известен способ экстракции R-формы ЛПС с использованием смеси фенол-хлороформ-петролейный эфир. Первоначально бактериальную культуру трижды суспензируют в смеси 90% фенол-хлороформ-петролейный эфир соотношении 2:5:8, затем смесь перемешивают в течение 15 минут, при этом постоянно охлаждая полученную смесь, далее центрифугируют 15 мин при 5000 g. Затем для того, чтобы удалить хлороформ и петролейный эфир из надосадочной жидкости смесь выдерживают на роторном испарителе при 40°C. Далее к очищенной от хлороформа и петролейного эфира смеси добавляют по каплям дистиллированную воду до момента выпадения ЛПС в видимый осадок. На следующем этапе удаляют фенол из полученного раствора путем добавления в раствор 6-кратного объема охлажденной смеси серного эфира и ацетона.

Также существует метод водно-фенольной экстракции бактериальных ЛПС (Galanos et.al, 1988) с сопутствующей очисткой от высокомолекулярных соединений, в частности нуклеиновых кислот, путем обработки детергентом Тритон X-114 при 0°C и осаждения холодным ацетоном.

Стоит отметить, что указанные выше методики, а также аналогичные им, имеют некоторые недостатки, в частности главным из них является то, что используемый в процедуре выделения ЛПС фенол достаточно сильно влияет на молекулярную организацию и биологические свойства эндотоксина. Помимо этого, фенол можно охарактеризовать как летучее, агрессивное и достаточно вредное для человека соединение. Именно поэтому был разработан целый ряд щадящих методик, предусматривающих исключение вредных факторов и основанных в основном на предварительном лизисе бактерий с последующими этапами – депротеинизацией протеазами и обработкой нуклеазами.

Следующий известный метод экстракции – выделение ЛПС по Darveau, отличающийся своей трудоемкостью и дороговизной. Метод включает следующие этапы:

- I. обработка суспензии микробных клеток панкреатическими нуклеазами (ДНК-аза, РНК-аза);
- II. деструкция обработанных клеток продавливанием их через French-press;
- III. обработка промежуточной суспензии микробных клеток панкреатическими нуклеазами (ДНК-аза, РНК-аза);
- IV. обработка раствором, содержащим ЭДТА и SDS, с целью разрушения молекулярных связей;
- V. двукратная депротеинизация материала проназой;
- VI. осаждение этанолом и лиофилизация.

Также известен метод выделения ЛПС из бактериальных клеток, состоящий всего из нескольких этапов, в ходе которых получают готовые для дальнейших исследований препараты ЛПС (Марков, Николаев, 1996). Основные этапы проведения экстракции по указанному методу:

- I. кипячение бактериальной суспензии в течение 10 мин в лизирующем буфере 1М Трис-НСl рН 6.8 (содержит 2% SDS и 4% меркаптоэтанола);
- II. обработка протеиназой К в течение 60 мин при температуре 56-60°C.

Стоит отметить, что SDS, применяемый на первом этапе выделения, существенно осложняет процедуру очистки готового препарата ЛПС, поскольку является трудноудаляемым компонентом и, таким образом, снижающим качество готового препарата ЛПС.

Далее рассмотрим еще один запатентованный способ выделения ЛПС из бактериальных клеток (Бурыгин и др., 2004), в соответствии с которым выполняют следующий ряд манипуляций:

- I. экстракция буферным раствором, представляющим собой смесь растворов - ЭДТА (0.01-0.05 ммоль на 1 г влажных клеток), 0.1 ммоль фенилметансульфонилфторид и 1% детергент Тритона X-100);
- II. центрифугирование с целью отделения экстракта от интактных бактериальных клеток;
- III. депротеинизация протеиназой К до конечной концентрации 80 мкг/мл;
- IV. инкубация готовой смеси в течение 60 мин при температуре 56-60°C.

Данный способ был апробирован на культуре *Escherichia coli* и дал возможность выделять более чистый препарат ЛПС, максимально

освобожденный от примесей высокомолекулярных соединений, в том числе от SDS.

Следующий известный метод получения ЛПС, в частности конкретно *Yersinia pestis* - возбудителя чумы (Полунина и др., 2013).

Способ включает следующие этапы выделения:

- I. предварительная водно-солевая обработка суспензии бактериальных клеток;
- II. лизис буфером (0,1 М Трис-НСI рН 8.0, 10 ммоль ЭДТА, 1% Тритон X-100);
- III. деструкция бактериальных клеток ультразвуком;
- IV. обработка протеовибрином (160 мкг/мл) и инкубация при 37°C, рН 7.8-8.0 в течение 18 ч.;
добавление ледяной уксусной кислоты до рН 3.2-3.4 для очистки от нуклеиновых кислот и последующее осаждение при 5000 g в течение 30 мин.

Также был предложен способ выделения достаточно чистой фракции ЛПС *Chlamydia trachomatis*. Основные этапы выделения:

- I. экстракция ЛПС из бактериальных клеток 90%-ным водным раствором фенола при 50°C;
- II. отделение надосадочной жидкости центрифугированием и разведение 0,1 М трис-НСI буфером в соотношении 1:9;
- III. выделение ЛПС методом аффинной хроматографии на конканавалин-А-сефарозе 4В;
- IV. промывка 1 М раствором NaCl, забуференным трис-НСI буфером;
- V. элюция 0,4-0,45 М раствором N-ацетил-D-глюкозамина в трис-НСI буфере, диализ и лиофилизация.

Таким образом, выбор того или иного способа выделения препарата ЛПС должен быть обоснован конкретными экспериментальными целями, задачами, а также возможностями.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Объекты исследования

В качестве объекта исследования был выбран коллекционный штамм бактерии *Escherichia coli* №25922 (Коллекция Клиники БГМУ).

2.2. Приготовление селективных и дифференциально-диагностических питательных сред

Бульон Луриа-Бертани (по Миллеру) (Luria Bertani Broth, Miller, «HiMedia», Индия).

1. Применение:

питательная среда предназначена для культивирования и хранения рекомбинантных штаммов *Escherichia coli*, а также для обычного культивирования не очень прихотливых микроорганизмов.

2. Состав среды:

Ингредиенты	Вес, грамм/литр
Гидролизат казеина	15,00
Дрожжевой экстракт	5,00
Натрия хлорид	4,00
Конечное значение pH (при 25°C) 7,5 ± 0,2	

3. Ход приготовления питательной среды:

Размешивали 25,0 г порошка питательной среды в 1000 мл дистиллированной воды. Подогревали для полного растворения частиц. Стерилизовали автоклавированием при 1,1 атм (121°C) в течение 15 мин. Разливали в соответствующие емкости.

4. Культивирование в течение 18-24 ч при 35-37°C.

5. Принцип и оценка результата:

Бульон Луриа-Бертани имеет достаточное количество питательных веществ для роста рекомбинантных штаммов. Такие штаммы обычно являются производными *Escherichia coli* K12, дефицитного по синтезу витамина группы В. Из-за этого и других маркеров ауксотрофности, полученных в ходе мутагенеза, рекомбинантные штаммы могут утрачивать способность к росту на средах обедненного состава. Гидролизат казеина обеспечивает присутствие в среде пептидов, дрожжевой экстракт – витаминов группы В, хлорид натрия – ионов натрия для мембранного транспорта и поддержания оптимального осмотического давления.

2.3. Посев музейной культуры *Escherichia coli* на жидкую питательную среду

Посев микроорганизмов на жидкую питательную среду производился бактериологической петлей и осуществлялся следующим образом:

1. Бактериологическую петлю брали в правую руку и стерилизовали над пламенем горелки. В левую руку брали пробирку с питательной средой и выросшей на ней суточной культурой микроорганизма.
2. Затем удаляли пробку из пробирки мизинцем и безымянным пальцами правой руки, при этом, не выпуская из рук бактериологическую петлю.
3. Далее обязательно обжигали края открытой пробирки над пламенем горелки и только потом вводили стерильную, предварительно остуженную бактериологическую петлю, после чего захватывали небольшое количество микробной биомассы.

4. Затем аккуратно вынимали петлю из пробирки, после чего проводили над пламенем горелки горлышко пробирки и пробку, затем закрывали пробирку и помещали в отдельно стоящий штатив.
5. Культуру на бактериологической петле переносили в другую пробирку с приготовленной стерильной жидкой питательной средой.
6. Бактериологическую петлю после извлечения из пробирки прокаляли над пламенем горелки для сжигания оставшейся микробной массы.
7. Горлышко пробирки и пробку проводили над пламенем горелки, пробирку закрывали и помещали в термостат.

2.4. Условия культивирования микроорганизмов

Посевы инкубировали в течение 48 часов при температуре 38°C в колбах с питательным бульоном Лурия-Бертани (LB-среда), помещенных в термошейкер (Innova 43, New Brunswick) (амплитуда до 4 мм 350 об/мин).

2.5. Центрифугирование жидкой культуры для получения микробной массы

Содержимое колб с выросшей за 48 часов микробной культурой переливали в сосуды больших объемов (500 мл) и помещали в центрифугу (Avanti J-NC High Capacity Centrifuge, Beckman Coulter). Большие сосуды перед центрифугированием уравнивали, предварительно взвешивая на электронных весах. Использовалась следующая программа для центрифугирования – 6500 об/мин в течение 15 мин. После центрифугирования супернатант удаляли, а осадок/микробную массу использовали для дальнейшего исследования.

2.6. Приготовление рабочих растворов

- I. Приготовление фенола для выделения ЛПС:
к 18 г твердого фенола приливали 2 мл 2М Tris-HCL (pH 8,0) и перемешивали.
- II. Приготовление перегнанного ацетона:
предварительно высушивают ацетон прокаленным хлористым кальцием в течение 24 ч, после чего отфильтровывают и переливают в колбу Вюрца соответствующих размеров или в круглодонную колбу, снабженную дефлегматором. Затем добавляют кристаллический марганцевокислый калий из расчета 8-10 г на 1 л и 1,5-2 г углекислого натрия, добавляют в колбу капилляры и начинают перегонку на водяной бане.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

3.1. Экстракция липополисахаридов из клеточных стенок бактериальных клеток

Поскольку целью данного исследования являлась разработка эффективного метода получения высокочистого препарата ЛПС из клеточной стенки бактериальной клетки, нами была проведена работа по комбинированию, а также оптимизации и совершенствованию условий проведения эксперимента. Таким образом, нами было апробировано четыре методики выделения ЛПС.

Первый метод экстракции ЛПС характеризовался наличием следующих манипуляций:

1. К осажденной из питательной среды бактериальной массе, помещенной в плотно закрывающуюся пробирку типа Falcon объемом 10 мл, добавляли обводненный фенол, приготовленный путем добавления 2 мл 1М Tris-HCL (pH 8,0) к 8 г фенола в соотношении 2 мл на 0,5 г бактериальной массы.
2. Смесь перемешивали 2,5 часа на ротационном перемешивателе (Rotamix RM-1, Elmi) в режиме F6.
3. Содержимое пробирки осаждали в центрифуге (Centrifuge 5804 R, Eppendorf) при 4500 об/мин на холоду в течение 15 мин., после чего затем забирали нижнюю фазу в слив.
4. Добавляли хлороформ в соотношении 1,5 мл на 0,5 г начальной сырой бактериальной массы.
5. Повторно центрифугировали, водную фазу отбирали для элюции, а интерфазу отбирали в слив.

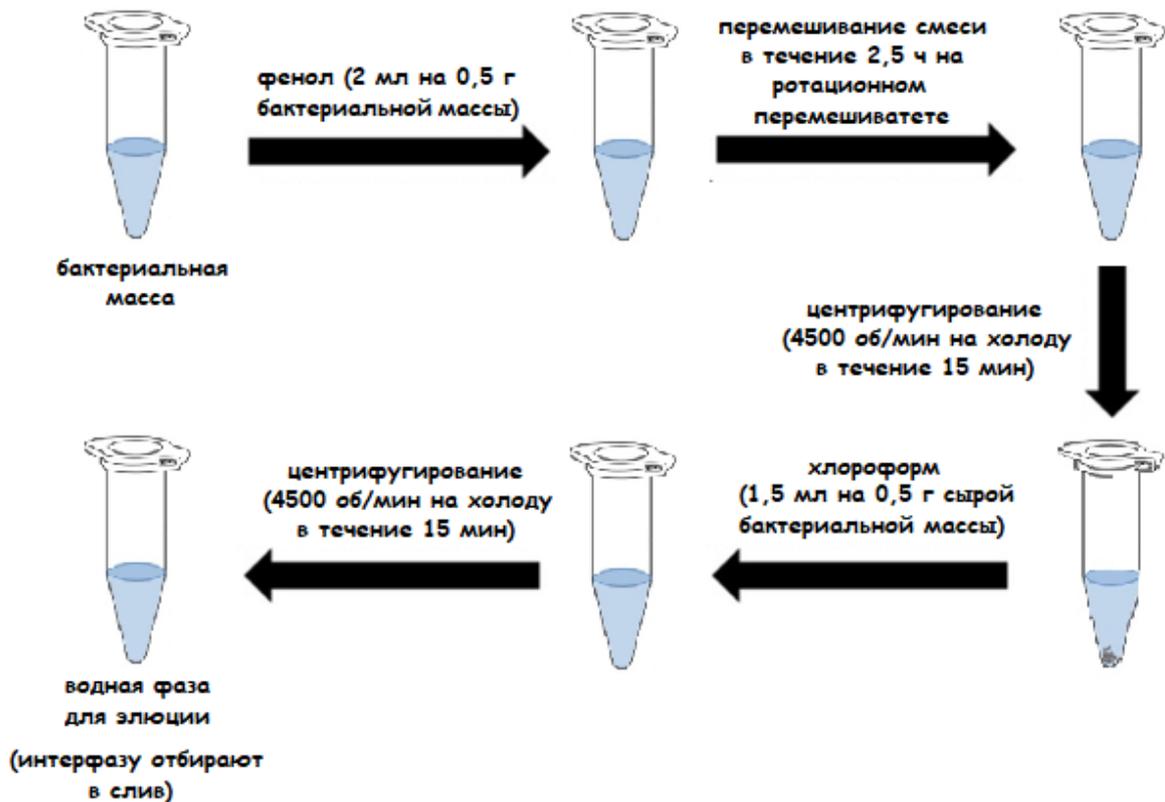


Рисунок 2 - Метод экстракции липополисахаридов №1

При выделении ЛПС с использованием второго метода экстракции ЛПС были осуществлены следующие этапы:

1. К осажденной из питательной среды бактериальной массе, помещенной в плотно закрывающуюся пробирку типа Falcon объемом 10 мл, добавляли «фенол для ЛПС» в соотношении 2 мл на 0,5 г начальной сырой массы клеток.

2. Смесь перемешивали 2,5 часа на ротационном перемешивателе (Rotamix RM-1, Elmi) в режиме F6, далее осаждали в центрифуге центрифуге (Centrifuge 5804 R, Eppendorf) при 4500 об/мин на холоду в течение 15 мин.

3. Забирали водную фазу и добавляли хлороформ в соотношении 1,5 к 0,5 г начальной сырой массы клеток, а также вносили дистиллированную воду и 96% этанол.

4. Центрифугировали и отбирали фенольную фазу в слив, а новую полученную водную фазу отбирали на элюцию. Оставшаяся фенольная фаза и интерфаза отбирались в слив.

Отличия от метода экстракции ЛПС №1: внесение не только хлороформа, но и добавление дистиллированной воды и спирта, а также забор на элюцию не только водной фазы, но и интерфазы.

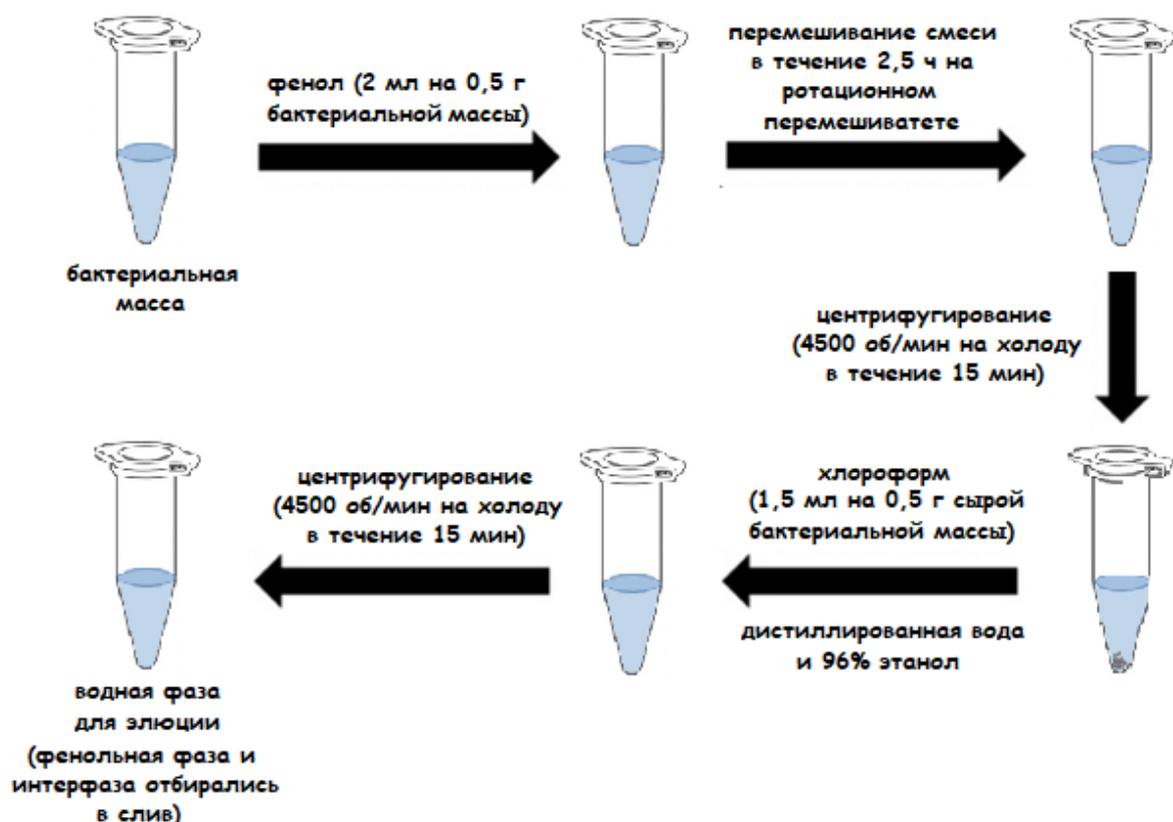


Рисунок 3 - Метод экстракции липополисахаридов №2

Третий метод экстракции ЛПС заключался в проведении следующих манипуляций:

1. К осажденной из питательной среды бактериальной массе, помещенной в плотно закрывающуюся пробирку типа Falcon объемом 10 мл, добавляли «фенол для ЛПС» в соотношении 2 мл на 0.5 г бактериальной массы.

2. После добавления фенола смесь перемешивали 2,5 часа на ротационном перемешивателе (Rotamix RM-1, Elmi) в режиме F6.
3. Осаждали в центрифуге (Centrifuge 5804 R, Eppendorf) при 4500 об/мин на холоду в течение 15 мин.
4. Добавляли 96% этанол и дистиллированную воду в соотношении 1:2.
5. Осаждали в центрифуге при 4500 об/мин на холоду в течение 15 мин.
6. Водную фазу отбирали для элюции, а фенольную фазу и интерфазу отбирали в слив.

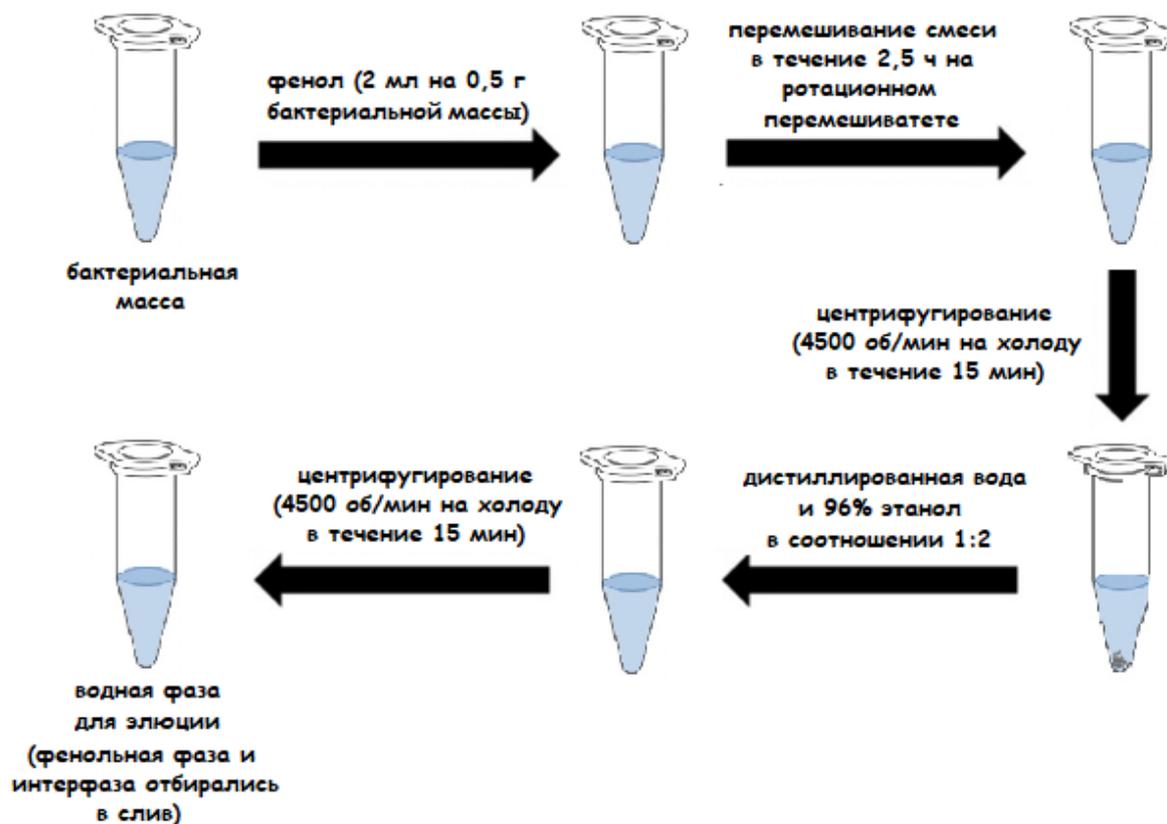


Рисунок 4 - Метод экстракции липополисахаридов №3

Отличия от метода экстракции ЛПС №2: мы не стали забирать нижнюю фазу после центрифугирования в слив; не происходило добавление хлороформа, но после первого центрифугирования

происходило добавление дистиллированной воды и спирта; забор на элюцию происходил только верхней фазы.

Четвертая методика выделения ЛПС характеризовалась наличием следующих этапов:

1. К осажденной из питательной среды бактериальной массе, помещенной в стеклянный сосуд объемом 5 мл, добавляли 1 мл буфера 1М Tris-HCL (pH 8,0).

2. Сосуд с получившимся раствором помещали в автоклав (Autester SP DRY PV Класс B) на 25 мин.

3. После остывания бактериальную массу помещали в плотно закрывающуюся пробирку типа Falcon объемом 10 мл и добавляли «фенол для ЛПС» в соотношении 2 мл на 0.5 г бактериальной массы.

4. После добавления фенола смесь перемешивали 2,5 часа на ротационном перемешивателе (Rotamix RM-1, Elmi) в режиме F6.

5. Осаждали в центрифугированием (Centrifuge 5804 R, Eppendorf) при 4500 об/мин на холоду в течение 15 мин.

6. Вводную фазу отбирали для элюции, а фенольную фазу и интерфазу отбирали в слив.

Отличия от метода экстракции ЛПС №3: дезинтеграцию бактериальной клетки производили автоклавом; к осажденной из питательной среды бактериальной массе, помещенной в стеклянный сосуд объемом 5 мл, добавляли 1 мл буфера 1М Tris-HCL (pH 8,0), сосуд с получившимся раствором помещали в автоклав на 25 мин; забор нижней фазы проводили после первого центрифугирования без добавления спирта и дистиллированной воды.

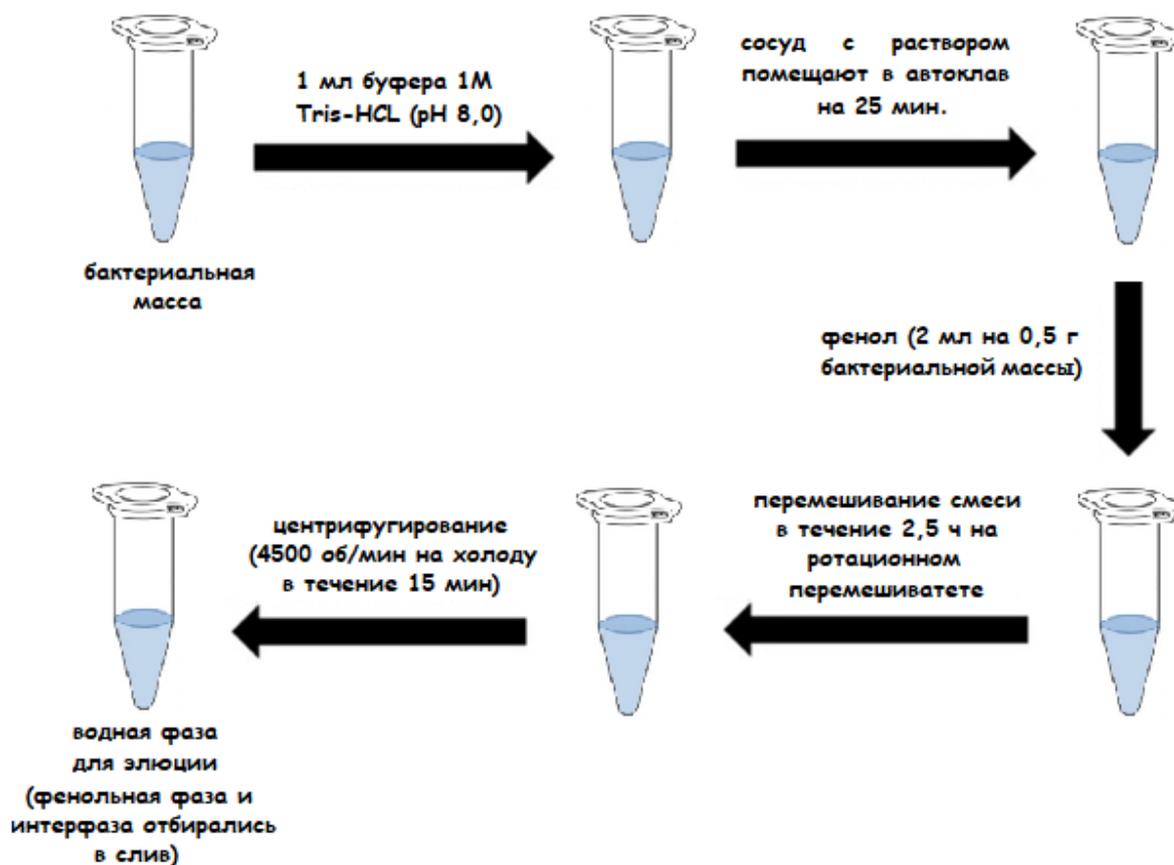


Рисунок 5 - Метод экстракции липополисахаридов №4

3.2. Выделение липополисахаридов с помощью колоночной хроматографии

Очистку и фракционирование ЛПС осуществляли методом жидкостной колоночной хроматографии в стеклянной колонке, заполненной силикагелем. Для этого экстракты помещали на подготовленную чашку Петри с силикагелем и высушивали. Чистая стеклянная колонка заполнялась силикагелем (60-200 mesh, Macherey-Nagel), который затем промывали смесью триэтиламина и ацетона (100 мл 10% Et₃N), затем избыток Et₃N отмывали ацетоном до тех пор, пока не пропадал запах амина. После силикагель, пропитывали экстрактом и проводили элюцию в присутствии этанола. Элюаты собирали последовательно в химические стаканы порциями по 20 мл, которые упаривали на роторном испарителе (Acid-Resistant CentriVap) сначала до 1

мл, а затем на вакуумном концентраторе (Eppendorf 5301 Vacufuge Concentrator System) досуха. Препараты одной фракции объединяли и подвергали дальнейшему анализу.

3.3. Подтверждение состава липополисахаридов

Анализ полученных препаратов проводили с помощью ядерной магнитной резонансной спектроскопии с использованием прибора ЯМР-спектрометра Bruker AM 500 (Bruker, Германия) с рабочей частотой 500 МГц. Предварительно образцы растворяли в дейтериевой воде или дейтероацетоне. Для каждого из образцов снимали спектры, которые подтверждали наличие ЛПС в анализируемых препаратах (рисунок 6). Результаты проверки полученных препаратов ЛПС музейного штамма *Escherichia coli* представлены в таблице 1.

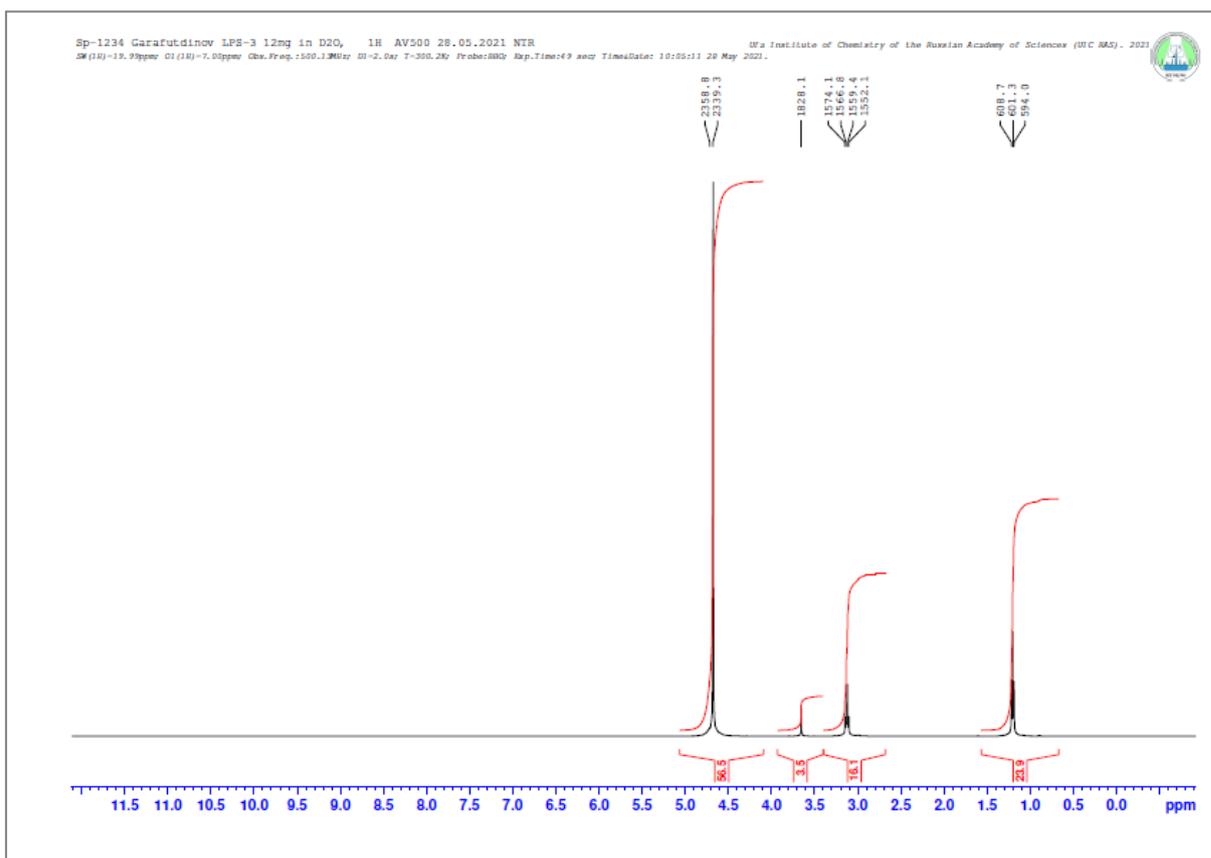


Рисунок 6 – ЯМР-спектр анализируемых образцов

Таблица 1 – Результаты анализа препаратов ЛПС с помощью ЯМР-спектроскопии

Модификации	I	II	III	IV
Используемое вещество	Водная фаза	Водная фаза + Интерфаза	Водная фаза	Водная фаза
Сырая биомасса (г)	0,956	1,045	2,596	2,534
Масса ЛПС (г)	0,1071	0,2428	0,249	0,2693
% Выхода	11,2%	23,2%	9,6%	10,6%

При выделении ЛПС с использованием первой методики было получено 0,1071 г чистого веса ЛПС на 0,956 г сырой биомассы, выход при этом составил 11,2%. Экстракция с использованием трех других методик позволила получить большую массу ЛПС в сравнении с выходом при экстракции по первой методике. В частности, при использовании второй модификации было получено 0,2428 г чистого веса ЛПС на 1,045 г сырой биомассы, при третьей методике - 0,249 г ЛПС на 2,596 г сырой биомассы, при четвертой модификации методики - 0,2693 г ЛПС на 2,534 г сырой биомассы. Выход ЛПС в ходе проведения второй, третьей и четвертой методики экстракции ЛПС из клеточной стенки ГОБ составил 23,2%, 9,6% и 10,6% соответственно. Таким образом, анализируя полученные данные, можно сделать вывод, что наиболее эффективной методикой, характеризующейся более высокой производительностью и, как следствие, большим процентом выхода ЛПС при экстракции из клеточной стенки ГОБ, является вторая модификация способа выделения ЛПС.

Также стоит отметить, что проведенный анализ полученных результатов позволил убедиться в применимости колоночной хроматографии для выделения ЛПС ГОБ. Использование в качестве неподвижной фазы силикагеля, проведение элюции в градиентном режиме

путем последовательной смены смесей растворителей (ацетон-этанол-триэтиламин, этанол-триэтиламин и этанол-вода-три-этиламин) доказали свою эффективность. Также немало важным стал тот факт, что в ходе проведения модификаций методики экстракции удается отделить ЛПС от нуклеиновых кислот, близких по физико-химическим свойствам к ЛПС и затрудняющим дальнейший анализ с использованием других методов. Все выше перечислены факторы делают возможным получение чистых препаратов ЛПС и/или его фракций в достаточном количестве для дальнейшего изучения и анализа.

ВЫВОДЫ

1. Анализ полученных данных позволил выбрать наиболее лучшую методику выделения ЛПС, характеризующуюся более высокой эффективностью, производительностью и позволяющую освободиться от большей части контаминирующих высокомолекулярных органических соединений, в том числе от нуклеиновых кислот.

2. В ходе проведения экспериментов была продемонстрирована эффективность применения колоночной хроматографии для выделения ЛПС грамотрицательных бактерий с применением в качестве неподвижной фазы силикагеля и проведение элюции в градиентном режиме путем последовательной смены смесей растворителей.

3. Новый метод выделения препаратов ЛПС из клеточной стенки бактериальных клеток в перспективе может быть использован для получения субстанций ЛПС и/или его фракций в достаточном количестве для производства иммуномодулирующих препаратов, имеющих ряд преимуществ над синтетическими и полусинтетическими препаратами.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Аниховская, И. А. Кишечный эндотоксин как универсальный фактор адаптации и патогенеза общего адаптационного синдрома / И. А. Аниховская [и др.] // Физиология человека. – 2006. – №2. – С. 87–91.
2. Апарин П.Г., Львов В.Л., Елкина С.И., Головина М.Э., Шмиголь В.И. Способ выделения биологически активной фракции (БАФ), содержащей s-липополисахариды (S-ЛПС) из грамотрицательных бактерий // Патент RU 2260053, опубл. 10.09.2005 г.
3. Бондаренко, В. М. Антиэндотоксиновый иммунитет в регуляции численности эшерихиозной микрофлоры кишечника / В. М. Бондаренко, В. Г. Лиходед. – М.: Медицина, 2007 – 216 с.
4. Бондаренко, В. М. Определение эндотоксина грамотрицательных бактерий в крови человека / В. М. Бондаренко, В. Г. Лиходед, М. Ю. Яковлев // Журн. микробиол. – 2002. – №2. – С. 83–89.
5. Бурыгин Г.Л., Матора Л.Ю., Щеголев С.Ю. Способ получения липополисахаридов // Патент RU 2237719, опубл. 10.10.2004 г.
6. Варбанец, Л. Д. Методы исследования эндотоксинов / Л. Д. Варбанец, Г. М. Здоровенко, Ю. А. Книрель. – Киев: Наук. думка, 2006. – 233 с.
7. Варбанец, Л. Д. Структура, функция, биологическая активность эндотоксинов грамотрицательных бактерий / Л. Д. Варбанец, Н. В. Винарская // Совр. проблемы токсикологии. – 2002. – №1. – С. 33–45.
8. Вестфаль, О. Бактериальные липополисахариды / Методы химии углеводов / О. Вестфаль, К. Янн . – М.: Мир, 1967. – С. 325–332.
9. Вышегуров, Я. Х. Кишечный эндотоксин в патогенезе воспалительной патологии глаз и антиэндотоксиновая составляющая ее лечения / Я. Х. Вышегуров [и др.] // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. – 2007. – №1. – С. 12–14.

10. Вышегуров, Я. Х. Кишечный эндотоксин как облигатный фактор патогенеза эндогенных иридоциклов и эндофтальмитов неясной этиологии / Я. Х. Вышегуров [и др.]. – М.: СД–Пресс, 2006. – 133 с.

11. Иванов, Д. В. Этиология внутрибольничных хирургических инфекций, вызванных граморицательными бактериями, и профиль их антибиотикорезистентности / Д. В. Иванов, И. В. Крапивина // Журн. микробиол. – 2007. – №5. – С. 90–93,

12. Кабанов, Д. С. Связь между физико-химическими характеристиками и биологической активностью липополисахаридов / Д. С. Кабанов, И. Р. Прохоренко // Биол. мембраны. – 2011. – 28, №5. – С. 323–338.

13. Кабанов, Д. С. Структурный анализ липополисахаридов граморицательных бактерий / Д. С. Кабанов, И. Р. Прохоренко // Биохимия (Российская академия наук). – 2010. – 75, №4. – С. 469–491.

14. Козлов, Р. С. Стратегия использования антимикробных препаратов как попытка ренессанса антибиотиков / Р. С. Козлов, А. В. Голуб // Клин. Микробиол. Антимикроб. Химиотер. – 2011. – №12. – С. 322–334.

15. Конев, Ю. В. Эндотоксин (ЛПС) в патогенезе атеросклероза / Ю. В. Конев, Л. В. Лазебник // Эксп. и клин. гастроэнтерол. – 2011. – №11. – С. 15–26.

16. Кочинкова, Д. Структурное разнообразие коровой олигосахаридной области липополисахарида / Д. Кочинкова, Д. С. Лэм // Биохимия (Российская академия наук). – 2011. – 76, №7. – С. 925–931.

17. Марков Е.Ю., Николаев В.Б. Способ получения бактериальных липополисахаридов // Патент RU 2051969, опубл. 10.01.1996 г.

18. Мешков, М. В. Кишечный эндотоксин в регуляции активности системы гемостаза и патогенезе ДВС-синдрома / М. В. Мешков [и др.] // Физиол. человека. – 2005. – №6. – С. 131–136.

19. Окорочков, П. Л. Кишечный эндотоксин в индукции сахарного диабета первого типа / П. Л. Окорочков [и др.] // Физиология человека. – 2011. – 37, № 2. – С. 138–141.
20. Плосконос М.В., Николаев А.А. Способ выделения липополисахарида *Chlamydia trachomatis* // Патент RU 2593946, опубл. 10.08.2016 г.
21. Полунина Т.А., Гусева Н.П., Кузьмиченко И.А., Девдариани З.Л., Заднова С.П., Степанов А.В., Киреев М.Н. Способ получения липополисахарида возбудителя чумы // Патент RU 2483112, опубл. 27.05.2013 г.
22. Титов, В. Н. Липополисахариды грамотрицательных бактерий как экзогенные патогены. Транслокация бактерий *in vivo*, воспаление и патология сердечно–сосудистой системы / В. Н. Титов, С. Ф. Дугин, К. Л. Коткин // Клини. лаб. диагностика. – 2005. – № 8. – С. 23–38.
23. Хасанова, Г. Р. Кишечный эндотоксин как вероятный индуктор системного воспалительного ответа при ВИЧ-инфекции / Г. Р. Хасанова [и др.] // Практическая медицина. – 2012. – №1 (56). – С. 52–55.
24. Balistreri, C. R. LPS-mediated production of pro/anti-inflammatory cytokines and eicosanoids in whole blood samples: biological effects of +896A/G TLR4 polymorphism in a Sicilian population of healthy subjects / C. R. Balistreri [et al.] // Mech. Ageing Dev. – 2011. – 132, N3. – P. 86–92.
25. Bohm M., Richter J., Kelsen S. et al. Esophageal dilation: simple and effective treatment for adults with eosinophilic esophagitis and esophageal rings and narrowing // Dis. Esophagus. – 2010. – Vol. 23. – P. 377–385.
26. Boroni Moreira, A. P. The influence of endotoxemia on the molecular mechanisms of insulin resistance / A. P. Boroni Moreira, R. de Cássia Gonçalves Alfenas // Nutr. Hosp. – 2012. – 27, N2. – P. 382–390.
27. Bosshart H., Heinzelmann M. Targeting bacterial endotoxin: two sides of a coin. Ann. NY Acad. Sci., 2007, v.1096, p.1-17.

28. Boutagy N. E. Metabolic endotoxemia with obesity: Is it real and is it relevant? / N. E. Boutagy [et al.] // *Biochimie.* – 2016. – 124. – P. 11–20.
29. Brandenburg, K. Conformation and supramolecular structure of lipid A / K. Brandenburg, U. Seydel // *Adv. Exp. Med. Biol.* – 2009. – 667. – P. 25–38.
30. Brandenburg, K. Endotoxins: relationship between structure, function, and activity / K. Brandenburg, A. B. Schromm, T. Gutschmann // *Subcell Biochem.* – 2010. – 53. – P. 53–67.
31. Brandenburg, K. Endotoxins: relationships between structure, function, and activity / K. Brandenburg, A. Wiese // *Curr. Top. Med. Chem.* – 2004. – 4, N11. – P. 1127–1146.
32. Brandtzaeg, P. Function of mucosa-associated lymphoid tissue in antibody formation / P. Brandtzaeg // *Immunol. Invest.* – 2010. – 39, N4–5. – P. 303–355.
33. Buttenschoen, K. Endotoxin elimination in sepsis: physiology and therapeutic application / K. Buttenschoen, P. Radermacher, H. Bracht // *Langenbecks Arch. Surg.* – 2010. – 395, N6. – P. 597–605.
34. Chapman, S. Gram-negative sepsis in the intensive care unit: avoiding therapeutic failure / S. Chapman, J. R. Iredell // *Curr. Opin. Infect. Dis.* – 2008. – 21, N6. – P. 604–609.
35. Charalambous, B. M. Role of bacterial endotoxin in chronic heart failure: the gut of the matter / B. M. Charalambous [et al.] // *Shock.* – 2007. – 28, N1. – P. 15–23.
36. Cross, A. S. Anti-endotoxin vaccines: back to the future / A. S. Cross // *Virulence.* – 2014. – 5, N1. – P. 219–225.
37. Cross, A. S. Development of an anti-endotoxin vaccine for sepsis / A. S. Cross // *Subcell Biochem.* – 2010. – 53. – P. 285–302.
38. Das, A. P. Recent advances in biosensor based endotoxin detection / A. P. Das, P. S. S. Kumar Swain // *Biosens. Bioelectron.* – 2014. – 51. – P. 62–75.

39. Galanos C, Jiao BH, Komuro T, Freudenberg MA, Luderitz O. Large-scale fractionation of S-form lipopolysaccharide from *Salmonella abortus equi*. Chemical and serological characterization of the fractions. *J Chromatogr.* 1988 May 25; 440: 397-404.
40. Giske, C. G. [et al.] // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 2008. – 52, N3. – P. 813–821. Clinical and economic impact of common multidrug-resistant gram-negative bacilli / C. G. Giske [et al.] // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 2008. – 52, N3. – P. 813–821.
41. Kabanov, D. S. Structural analysis of lipopolysaccharides from gram-negative bacteria / D. S. Kabanov, I. R. Prokhorenko // *Biochemistry.* – 2010. – 75, N4. – P. 383–404.
42. Kagan, J. C. Lipopolysaccharide Detection across the Kingdoms of Life / J. C. Kagan // *Trends Immunol.* – 2017. – 24. – P. 32-40.
43. Li, Y. Impact of nosocomial infections surveillance on nosocomial infection rates: A systematic review / Y. Li [et al.] // *Int. J. Surg.* – 2017. – 42. – P. 164–169.
44. Niederbichler, A. D. Burn-induced heart failure: lipopolysaccharide binding protein improves burn and endotoxin-induced cardiac contractility deficits / A. D. Niederbichler [et al.] // *J. Surg. Res.* – 2011. – 165, N1. – P. 128–135.
45. Opal, S. M. Endotoxin as a drug target / S. M. Opal, T. Gluck // *Crit. Care Med.* – 2003. – 31, N1 (Suppl). – S57–S64.
46. Opal, S. M. Endotoxins and other sepsis triggers / S. M. Opal // *Contrib. Nephrol.* – 2010. – 167. – P. 14–24.
47. Opal, S. M. The host response to endotoxin, antilipopolysaccharide strategies, and the management of severe sepsis / S. M. Opal // *Int. J. Med. Microbiol.* – 2007. – 297, N5. – P. 365–377.
48. Rachoin, J. S. Targeting endotoxin in the treatment of sepsis / J. S. Rachoin, C. A. Schorr, R. P. Dellinger // *Subcell Biochem.* – 2010. – 53. – P. 323–338.

49. Rajili-Stojanovi, M. Function of the microbiota / M. Rajili-Stojanovi // Best Practice & Research Clinical Gastroenterology. – 2013. – 27. – P. 5–16.

50. Sakata, M. Limulus ameocyte lysate assay for endotoxins by an adsorption method with polycation-immobilized cellulose beads / M. Sakata [et al.] // Anal. Sci. – 2010. – 26, N3. – P. 291–296.

51. Satoh, M. Clearance of bacterial lipopolysaccharides and lipid A by the liver and the role of argininosuccinate synthase / M. Satoh [et al.] // Innate Immun. – 2008. – 14, N1. – P. 51–60.



СПРАВКА

Башкирский государственный медицинский университет

о результатах проверки текстового документа на наличие заимствований

ПРОВЕРКА ВЫПОЛНЕНА В СИСТЕМЕ ANTIPLAGIAT.VUZ

Автор работы: Миронов Никита Константинович
Самоцитирование
рассчитано для: Миронов Никита Константинович
Название работы: РАЗРАБОТКА МЕТОДИЧЕСКИХ ПОДХОДОВ К ОПРЕДЕЛЕНИЮ СОДЕРЖАНИЯ ЛИПОПОЛИСАХАРИДОВ В КЛЕТОЧНОЙ СТЕНКЕ БАКТЕРИАЛЬНОЙ КЛЕТКИ
Тип работы: Выпускная квалификационная работа
Подразделение: ФГБОУ ВО БГМУ Минздрава России

РЕЗУЛЬТАТЫ

■ ОТЧЕТ О ПРОВЕРКЕ КОРРЕКТИРОВАЛСЯ: НИЖЕ ПРЕДСТАВЛЕНЫ РЕЗУЛЬТАТЫ ПРОВЕРКИ ДО КОРРЕКТИРОВКИ

ЗАИМСТВОВАНИЯ	26.28%	ЗАИМСТВОВАНИЯ	27.09%
ОРИГИНАЛЬНОСТЬ	54.3%	ОРИГИНАЛЬНОСТЬ	71.62%
ЦИТИРОВАНИЯ	19.42%	ЦИТИРОВАНИЯ	1.29%
САМОЦИТИРОВАНИЯ	0%	САМОЦИТИРОВАНИЯ	0%

ДАТА ПОСЛЕДНЕЙ ПРОВЕРКИ: 18.06.2021

ДАТА И ВРЕМЯ КОРРЕКТИРОВКИ: 18.06.2021 10:58

Модули поиска: ИПС Адилет; Модуль поиска "БГМУ"; Библиография; Сводная коллекция ЭБС; Интернет Плюс; Сводная коллекция РГБ; Цитирование; Переводные заимствования (RuEn); Переводные заимствования по eLIBRARY.RU (EnRu); Переводные заимствования по Интернету (EnRu); Переводные заимствования издательства Wiley (RuEn); eLIBRARY.RU; СПС ГАРАНТ; Медицина; Диссертации НББ; Перефразирования по eLIBRARY.RU; Перефразирования по Интернету; Патенты СССР, РФ, СНГ; Шаблонные фразы; Кольцо вузов; Издательство Wiley; Переводные заимствования

Работу проверил: Кобзева Наталья Рудольфовна
 ФИО проверяющего

Дата подписи: 18.06.2021

ФГБОУ ВО БГМУ
 Минздрава России
 НАУЧНАЯ БИБЛИОТЕКА

Подпись проверяющего

Справка введена с отключенным модулем библиографических записей.



Чтобы убедиться в подлинности справки, используйте QR-код, который содержит ссылку на отчет.

Ответ на вопрос, является ли обнаруженное заимствование корректным, система оставляет на усмотрение проверяющего. Предоставленная информация не подлежит использованию в коммерческих целях.

РЕЦЕНЗИЯ

на выпускную квалификационную работу студента группы Б-401 А группы
(Форма выпускной квалификационной работы) (Шифр группы)

Миронова Никиты Константиновича

(Фамилия, имя, отчество полностью)

на тему: «Разработка методических подходов к определению содержания липополисахаридов в клеточной стенке бактериальной клетки»

1 Объем текстовой части (пояснительной записки) и иллюстрационно-графического материала, соответствие наименования и содержания разделов работы заданию, выданному кафедрой.

Полностью соответствует

2 Актуальность тематики проблемы, решаемой в выпускной квалификационной работе, и качество ее решения Тема выпускной квалификационной работы очень актуальна

3 Основные достоинства и недостатки выпускной квалификационной работы. выпускная квалификационная работа выполнена в соответствии с требованиями, проведен большой анализ литературных источников по заявленной тематике.

4 Техничко-экономические, социально-экономические, экологические обоснования, обоснования вопросов безопасности жизнедеятельности, разработанные в выпускной квалификационной работе имеет социально-экономическое значение в микробиологической науке.

5 Уровень использования вычислительной техники и программных средств _____

Освоены методы планирования и анализа

6 Апробация и реализация результатов, полученных в выпускной квалификационной работе: патенты, внедрения, публикации, сообщения на конференциях и др. -

7 Практическая и теоретическая подготовленность выпускника к выполнению профессиональных задач. отличный уровень подготовки

8 Качество оформления текстовой части (пояснительной записки) и иллюстрационно-графического материала в соответствии с требованиями действующих стандартов и регламентов. _____

Работа оформлена в соответствии с требованиями

9 Обоснованность выводов и предложений _____

Автором тема глубоко изучена и проработана, заслуживают внимания результаты и обсуждение

10 Замечания по усмотрению рецензента Замечаний нет

(дополнительные замечания представлены на _____ листах приложения)

11 Возможность использования результатов, полученных в выпускной квалификационной работе, для публикации, реализации в учебном процессе, рекомендуемых к внедрению или др. _____

Результаты могут быть использованы в дальнейшем в учебном процессе и для публикаций

12 Оценка выпускной квалификационной работы ("отлично", "хорошо", "удовлетворительно", "неудовлетворительно") и рекомендация о присвоении (не присвоении) студенту-выпускнику квалификации (степени). _____

Выпускная квалификационная работа заслуживает оценки «отлично» и студенту выпускнику рекомендуется присвоить квалификацию бакалавр

Рецензент

ФБУН ГНЦ ПМБ, зам. директора по научно-производственной работе,
профессор, д.б.н.
(Место работы, занимаемая должность)



А.П. Шепелин
А.П. Шепелин

РЕЦЕНЗИЯ

на выпускную квалификационную работу студента группы
(Форма выпускной квалификационной работы)

Б-401 А группы
(Шифр группы)

Миронова Никиты Константиновича

(Фамилия, имя, отчество полностью)

на тему: «Разработка методических подходов к определению содержания липополисахаридов в клеточной стенке бактериальной клетки»

1 Объем текстовой части (пояснительной записки) и иллюстрационно-графического материала, соответствие наименования и содержания разделов работы заданию, выданному кафедрой.

соответствует

2 Актуальность тематики проблемы, решаемой в выпускной квалификационной работе, и качество ее решения Тема выпускной квалификационной работы актуальна

3 Основные достоинства и недостатки выпускной квалификационной работы. выпускная квалификационная работа выполнена в соответствии с требованиями

4 Техничко-экономические, социально-экономические, экологические обоснования, обоснования вопросов безопасности жизнедеятельности, разработанные в выпускной квалификационной работе - имеет социально-экономическое значение.

5 Уровень использования вычислительной техники и программных средств _____

В соответствии с решаемыми задачами

6 Апробация и реализация результатов, полученных в выпускной квалификационной работе: патенты, внедрения, публикации, сообщения на конференциях и др. - запланированы

7 Практическая и теоретическая подготовленность выпускника к выполнению профессиональных задач. В соответствии с требованиями ФГОС

8 Качество оформления текстовой части (пояснительной записки) и иллюстрационно-графического материала в соответствии с требованиями действующих стандартов и регламентов. _____

Работа оформлена в соответствии с требованиями

9 Обоснованность выводов и предложений _____

Выводы и предложения обоснованы и соответствуют поставленным задачам

10 Замечания по усмотрению рецензента Отсутствуют

(дополнительные замечания представлены на _____ листах приложения)

11 Возможность использования результатов, полученных в выпускной квалификационной работе, для публикации, реализации в учебном процессе, рекомендуемых к внедрению или др. _____

Результаты могут быть использованы для продолжения исследований при выполнении магистерской диссертации

12 Оценка выпускной квалификационной работы ("отлично", "хорошо", "удовлетворительно", "неудовлетворительно") и рекомендация о присвоении (не присвоении) студенту-выпускнику квалификации (степени). _____

Выпускная квалификационная работа заслуживает оценки «отлично».

рекомендуется присвоение квалификации бакалавр

Рецензент
ФГБОУ ВО БГМУ Минздрава России
зав.кафедра фармации ИДПО,
профессор, д.фарм.н.


Подпись Катаев В. А.
удостоверяю:
начальник управления кадров
ФГБОУ ВО БГМУ Минздрава России
«22» июне 2022 г.
ВЕДУЩИЙ СПЕЦИАЛИСТ
УПРАВЛЕНИЯ КАДРОВ
САМИГУЛЛИНА А.Р.

В.А.Катаев



ОТЗЫВ

на выпускную квалификационную работу студента группы Б-401 А группы
(Форма выпускной квалификационной работы) (Шифр группы)

Миронова Никиты Константиновича

(Фамилия, имя, отчество полностью)

на тему: «Разработка методических подходов к определению содержания липополисахаридов в клеточной стенке бактериальной клетки»

1 Объем текстовой части (пояснительной записки) и иллюстрационно-графического материала, соответствие наименования и содержания разделов работы заданию, выданному кафедрой.

Полностью соответствует

2 Актуальность тематики проблемы, решаемой в выпускной квалификационной работе, и качество ее решения Тема выпускной квалификационной работы актуальна

3 Основные достоинства и недостатки выпускной квалификационной работы. выпускная квалификационная работа выполнена в соответствии с требованиями.

4 Техничко-экономические, социально-экономические, экологические обоснования, обоснования вопросов безопасности жизнедеятельности, разработанные в выпускной квалификационной работе имеет социально-экономическое значение для охраны здоровья населения.

5 Уровень использования вычислительной техники и программных средств _____

Уверенный

6 Аprobация и реализация результатов, полученных в выпускной квалификационной работе: патенты, внедрения, публикации, сообщения на конференциях и др. – результаты подготовлены для отправки в журнал.

7 Практическая и теоретическая подготовленность выпускника к выполнению профессиональных задач. Готов для практической деятельности.

8 Качество оформления текстовой части (пояснительной записки) и иллюстрационно-графического материала в соответствии с требованиями действующих стандартов и регламентов. _____

Работа оформлена в соответствии с требованиями

9 Обоснованность выводов и предложений _____

Выводы и предложения обоснованы и соответствуют поставленным задачам

10 Замечания по усмотрению рецензента Отсутствуют

(дополнительные замечания представлены на _____ листах приложения)

11 Возможность использования результатов, полученных в выпускной квалификационной работе, для публикации, реализации в учебном процессе, рекомендуемых к внедрению или др. _____

Результаты могут быть использованы для продолжения исследований в рамках выполнения магистерской диссертации

12 Оценка выпускной квалификационной работы ("отлично", "хорошо", "удовлетворительно", "неудовлетворительно") и рекомендация о присвоении (не присвоении) студенту-выпускнику квалификации (степени). _____

Выпускная квалификационная работа заслуживает оценки «отлично».

Выпускнику рекомендуется присвоение квалификации - бакалавр

Научный руководитель:

ФГБОУ ВО БГМУ Минздрава России

Зав.кафедрой фундаментальной и прикладной

микробиологии, профессор, д.м.н.

Подпись Мавзютова А.Р.
достоверно.
Начальник управления кадров
ФГБОУ ВО БГМУ Минздрава России
«22» июни 2019г.

ВЕДУЩИЙ СПЕЦИАЛИСТ
УПРАВЛЕНИЯ КАДРОВ
САМИГУЛЛИНА А.Р.



А.Р. Мавзютов