

**ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
ВЫСШЕГО ПРОФЕССИОНАЛЬНОГО ОБРАЗОВАНИЯ
БАШКИРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

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

Пинчак Надежда Васильевна

**Анализ структуры липополисахаридов бактерий рода
*Sinorhizobium***

Руководитель:

к.б.н.

Р.Р. Гарафутдинов

профессор, д.м.н.

А.Р. Мавзютов

СОДЕРЖАНИЕ

Перечень условных обозначений (сокращений).....	3
ВВЕДЕНИЕ.....	4
ГЛАВА 1. Обзор литературы	
1.1. Иммуномодуляторы.....	6
1.1.1. Определение и классификация иммуномодуляторов.....	6
1.1.2. Фармакологическое действие иммуномодуляторов.....	8
1.2. Бактерии рода <i>Sinorhizobium</i>	12
1.3. Структура липополисахаридов.....	15
1.4. Методы анализа липополисахаридов.....	22
1.4.1. Высокоэффективная жидкостная хроматография.....	22
1.4.2. Ядерный магнитный резонанс.....	24
1.4.3. МАЛДИ-масс-спектрометрия.....	26
1.4.4. Инфракрасная (ИК) спектроскопия.....	28
ГЛАВА 2. Материалы и методы	31
ГЛАВА 3. Результаты и обсуждение.....	34
ВЫВОДЫ.....	41
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ.....	42

ПЕРЕЧЕНЬ УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ (СОКРАЩЕНИЙ)

ВЭЖХ - высокоэффективной жидкостной хроматографии

ЖХ – жидкостная хроматография

ИК – инфракрасная спектроскопия

ИЛ – интерлейкин

ИМ – иммуномодуляторы

ЛПС – липополисахарид

МАЛДИ - матрично-активированная лазерная десорбция/ионизация

ЯМР – ядерный магнитный резонанс

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы:

Липополисахариды – структурные компоненты мембран грамотрицательных бактерий, обеспечивающие структурную целостность бактериальной клетки и защищающие мембрану от агрессивных воздействий окружающей среды. Они являются углеводсодержащими биополимерами и состоят из липида А, олигосахаридного остова и олигосахаридных блоков, построенных из повторяющихся полисахаридных цепей.

Бактерии рода *Sinorhizobium* относятся к грамотрицательным бактериям, которые свободно обитают в почве и вступают в симбиоз с бобовыми растениями. На корнях образуют клубеньки, в которых бактерии фиксируют атмосферный азот. Важную роль в данном процессе играют поверхностные полисахариды бактерий, которых известно четыре типа. Одним из них являются липополисахариды. Липополисахариды бактерий рода *Sinorhizobium* могут быть выделены несколькими методами, например, основанными на фенольной экстракции по Вестфалю.

Химическая чистота препаратов липополисахаридов определяет возможность дальнейшего их фармакологического использования, поэтому важной задачей является доказательство идентичности субстанций липополисахаридов. Оно достигается путем анализа химической структуры липополисахаридов такими методами, как ядерный магнитный резонанс и масс-спектрометрия.

Цель исследования:

Изучить молекулярную структуру липополисахаридов бактерий рода *Sinorhizobium* с помощью инструментальных методов анализа.

Задачи исследования:

1. Получение чистого препарата липополисахаридов *Sinorhizobium meliloti*.
2. Анализ структуры липополисахаридов с помощью метода ЯМР.
3. Анализ структуры липополисахаридов с помощью метода ИК-спектроскопии.

Ожидаемая научно-практическая значимость:

Полученные в результате исследования препараты липополисахаридов с установленной чистотой могут быть использованы для изучения их фармакологических свойств.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Иммуномодуляторы

Иммунитет - защита организма от генетически чужеродных агентов эндогенного и экзогенного происхождения, направленная на поддержание и сохранение генетического гомеостаза организма, его структурной, функциональной, биохимической целостности и антигенной индивидуальности. Принцип работы защитных механизмов состоит в распознавании и переработке чужеродных структур. Защита осуществляется с помощью двух систем – неспецифического (врожденного, естественного) и специфического (приобретенного) иммунитета. Эти две системы представляют собой две стадии единого процесса защиты организма. По мере того, как изменяется активность и количество клеток иммунитета возникают заболевания иммунной системы: иммунодефицитные состояния, снижение количества иммунокомпетентных клеток. Их лечение проводят с помощью иммуотропных препаратов.

Иммуотропные препараты делят на: иммунодепрессанты и иммуностимуляторы (в том числе иммуномодуляторы).

1.1.1. Определение и классификация иммуномодуляторов

Иммуномодуляторы – это лекарственные препараты, восстанавливающие при применении в терапевтических дозах функции иммунной системы. В настоящее время по происхождению выделяют шесть групп иммуномодуляторов: микробные, тимические, костномозговые, цитокины, нуклеиновые кислоты и химически чистые. К препаратам микробного происхождения первого поколения можно отнести такие лекарственные средства, как пирогенал и продигиозан, представляющие собой полисахариды бактериального происхождения.

Они широко применялись в клинической практике для стимуляции противобактериального иммунитета. В настоящее время данные препараты применяются редко. К микробным препаратам следующего поколения относятся лизаты (Бронхомунал, ИРС-19, Имудон) и рибосомы (Рибомунил) бактерий, выделенных из таких возбудителей как *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus pneumoniae*, и др [Хаитов, Пинегин, 2005]. К микробным препаратам третьего поколения можно отнести ликопид, который состоит из природного дисахарида - глюкозаминилмурамил и присоединенный к нему синтетический дипептид – L-аланил-D-изоглутамин.

Первым из тимических препаратов в России стал Тактивин, представляющий собой комплекс пептидов, выделенных из тимуса крупного рогатого скота. Так же схожими по составу к относятся такие препараты, как Тималин, Тимоптин, Вилозен и др. Недостатком тимических препаратов является то, что они представляют собой смесь неразделенных биологически активных пептидов, которые тяжело стандартизировать.

В дальнейшем появились препараты второго и третьего поколения, которые являются синтетическими аналогами естественных гормонов тимуса или их фрагментов, обладающих биологической активностью. Данное направление разработки этой группы препаратов стало очень перспективным. На основе фрагмента, включающего аминокислотные остатки активного центра гормона тимопоэтина, создан синтетический гексапептид – Иммунофан [Хаитов и др., 2004].

Миелопид – родоначалиник препаратов костномозгового происхождения, в его состав входит комплекс миелопептидов. При дальнейшем изучении выяснилось, что группы миелопидов оказывают разные действия на иммунную систему. Например, миелопид-3 стимулирует фагоцитарную активность лейкоцитов.

Цитокины – сложный комплекс эндогенных иммунорегуляторных молекул, которые являются основой для создания иммуномодулирующих препаратов. Первая группа включает в себя суперлимф и лейкинферон, а вторая ронколейкин, бета-лейкин и лейкомакс.

Группу химически чистых иммуномодуляторов делят на две подгруппы: высокомолекулярные и низкомолекулярные. К низкомолекулярным относятся лекарственные средства, обладающие иммуотропной активностью. Первым стал левамизол, у которого были выявлены выраженные иммуностимулирующие свойства. Также известным лекарственным средством из данной подгруппы является галавит. Особенность этого препарата заключается в выраженных противовоспалительных свойствах.

Высокомолекулярные препараты получают при помощи направленного химического синтеза. К этой подгруппе относится препарат полиоксидоний. Он является N-оксидированным производным полиэтиленпиперазина. Препарат обладает фармакологическим действием и проявляет иммуномодулирующие, детоксицирующие, антиоксидантные и мембранопротекторные свойства.

Также к иммуномодулирующим лекарственным препаратам, можно отнести интерфероны и индукторы интерферонов. Интерфероны являются иммунорегуляторными молекулами общей цитокиновой сети организма, влияющие на все клетки иммунной системы.

1.1.2. Фармакологическое действие иммуномодуляторов

При анализе фармакологического действия иммуномодуляторов необходимо учитывать особенность функционирования иммунной системы, состоящую в том, что эта система «работает» как сеть сообщающихся весов, то есть наличие груза на одной из чашей приводит в движение всю систему [Петров, 1987]. Поэтому вне зависимости от того, как направлено влияние иммуномодулятора, в конечном итоге изменяется

функциональная активность всей иммунной системы. Так как, цитокины являются главными регуляторами иммунитета, они обладают разнообразным воздействием на иммунную систему.

В соответствии с приведенной выше классификацией иммуномодулирующих препаратов можно выделить следующие направления.

1) Иммуномодуляторы микробного происхождения

Главной мишенью для препаратов данной группы являются фагоцитарные клетки. Под воздействием этих иммуномодуляторов повышается фагоцитоз, увеличивается продукция цитокинов. Следствием этого может быть усиленная продукция антител, а также Т-хелперов и Т-киллеров. Наиболее полно изучено действие липополисахарида, который является компонентом клеточной стенки бактерий.

Мишенью липополисахарида в организме человека являются клетки моноцитарно-макрофагального звена. При действии данного иммуномодулятора происходит гибель микроорганизмов, синтез цитокинов, усиление продукции антител. Вследствие этого липополисахарид проявляет антиинфекционные, противоопухолевые действия [Пинегин, 2000].

2) Иммуномодуляторы тимического происхождения

Основной мишенью данных препаратов являются Т-лимфоциты. При исходно пониженных показателях препараты данного ряда повышает количество Т-клеток и их функциональную активность. Основное действие заключается в усилении продукции циклических пептидов, в результате чего происходит дальнейшая стимуляция дифференцировки и пролиферации предшественников Т-лимфоцитов. Вследствие этого возвращается к норме соотношение в организме CD4/CD8, увеличивается функциональная активность Т-клеток, инициация продукции цитокинов.

Результатом этого является повышение активности всех звеньев неспецифического иммунитета и усиление способности моноцитов уничтожать чужеродные агенты. Химический состав и механизм действия бестима похож на тимоген, основным результатом воздействия является инициация дифференцировки Т-клеток, усиление пролиферации и усиление образования Т-лимфоцитов. Это обусловлено способностью бестима усиливать продукцию интерферонов-2 и индикаторных цитокинов [Brozek et al., 1990].

Фармакологическое действие иммуномодулятора тимического происхождения - имунофана, заключается в усилении опытах *in vitro* и *in vivo* продукции ИЛ-2 лимфоцитами, повышении поглощения и гибели захваченных микроорганизмами лейкоцитов.

Также важным свойством имунофана является усиление антиоксидантной защиты организма, методом синтеза церулоплазмينا и лактоферрина. Он восстанавливает нормальное образование арахидоновой кислоты, уменьшает распад фосфолипидов в клеточной мембране, приводит в норму процесс окисления жиров [Бондаренко и др., 2013].

3) Иммуномодуляторы костномозгового происхождения

Основной мишенью в организме являются В-лимфоциты. При нарушении функций иммунной системы, введение миелопида приводит к увеличению митотической активности клеток костного мозга и процесс дифференцировки идет в сторону зрелых В-лимфоцитов. В составе миелопида есть такой компонент, как МП-1. Он воздействует на Т-хелперы, в результате чего происходит увеличение костномозговых клеток в сторону зрелых Т-лимфоцитов. Повышение их активности проявляется при стимуляции гуморального иммунного ответа.

4) Фармакологическое действие италикинов

Лейкинферон и суперлимфа – цитокиновые препараты, участвующие в воспалительном процессе. Суперлимфа воздействует на клетки-эффекторы врожденного иммунитета. Препарат регулирует миграцию фагоцитов в воспалительный очаг, также обладает антиоксидантной активностью.

Также существуют отечественные препараты беталейкин и ронколейкин, которые обладают плеiotропным действием на организм человека.

Главным фармакологическим свойством беталейкина является восстановление костномозгового кроветворения после рентгеновского облучения и усиление лейкопоза. Применение данного препарата позволяет проводить химиотерапию в соответствии с установленными сроками, а также добиться нормализации числа лейкоцитов в периферической крови.

5) Фармакологическое действие нуклеиновых кислот

Препараты данной группы в основном влияют на лейкопоз. Они повышают функциональную активность нейтрофилов и макрофагов, увеличивая способность разрушать и поглощать бактериальные клетки, повышают устойчивость к инфекциям благодаря инициации фагоцитоза, увеличивают активность Т-клеток, стимулируют пролиферацию В-лимфоцитов и синтез антител. Препараты, содержащие нуклеиновые кислоты способны уменьшать действия перекисных радикалов, а также пагубное воздействие химиотерапии на организм [Дентовская и др., 2006].

6) Фармакологическое действие химически чистых иммуномодуляторов

Галавит – один из представителей препаратов, относящийся к подгруппе низкомолекулярных иммуномодуляторов. Его основной

мишенью являются макрофаги. При применении данного препарата нормализуется продукция цитокинов, стимулирует функциональную активность нейтрофилов, повышает поглощение бактерий, в следствии чего происходит повышение устойчивости организма к инфекциям.

К группе высокомолекулярных препаратов относится препарат полиоксидоний, он обладает многогранным эффектом на организм. Данный препарат проявляет антиоксидантные, детоксицирующие, иммуномодулирующие и мембранно-протекторные эффекты.

1.2. Бактерии рода *Sinorhizobium*

Бактерии рода *Sinorhizobium* относятся к граммотрицательным бактериям, которые свободно обитают в почве и вступают в симбиоз с бобовыми растениями.

Отдельные культуры семейства *Rhizobiaceae* характеризуются избирательностью (специфичностью) по отношению к растению-хозяину. Имеются несколько классификаций клубеньковых бактерий, основанные на их способности заражать бобовые растения, но общепринятой является классификация Л.М. Доросинского [Доросинский, 1965]. В основу ее положена перекрестная заражаемость и ряд морфолого-культуральных свойств клубеньковых бактерий [Кретович, 1987; Емцев, Мишустин, 2005].

Первые представители рода *Sinorhizobium* были выделены в качестве симбионтов *Medicago* и *Trigonella* spp. [Crow et al., 1981]. Полученный штамм SU47 был использован для идентификации выделенных в Китае быстрорастущих ризобий, симбионтов сои [Webblock, Jarwis, 1986]. При помощи нумерической таксономии было предложено выделить полученные изоляты бактерий в отдельный род – *Sinorhizobium* [Chen et al., 1988]. На сегодняшний день род состоит из 4 видов: *S.meliloti*, *S.fredii*, *S.saheli* и *S.terangae*.

При прорастании семян бобовых растений устанавливается бобово-ризобиальный симбиоз. При развитии растения, корни выделяют

органические питательные вещества, которые стимулируют размножение ризосферных микроорганизмов, в том числе и клубеньковых бактерий. В процессе инфицирования бактериями корневой системы макросимбионта принято выделять несколько стадий. Первая – приближение микробной клетки к растению в ответ на узнавание химических продуктов, выделяемых из корней растения. Этот процесс называется хемотаксисом. Вторая стадия – контактное взаимодействие микро- и макросимбионта. В этот период происходит лектин-углеводное узнавание растения микроорганизмом. Углевод-связывающий белок корневых волосков растений лектин узнает углеводные молекулы на поверхности бактерий и прочно связывается с ними. Проникновение (третья стадия) сопровождается инвагинацией мембраны корневого волоска, образуется трубка, выстланная целлюлозой, вырабатываемой клетками растения-хозяина. В этой трубке, называемой инфекционной нитью, находятся интенсивно размножающиеся бактерии. Инфекционная нить проникает в кору корня и формируется со скоростью 100-200 мкм в течение суток.

В результате разрастания тканей, вызванного клубеньковыми бактериями при участии ростовых веществ, происходит образование клубеньков. В молодых клубеньках большинство бактерий представляет собой палочковидные клетки, однако в дальнейшем они приобретают неправильную форму и называются бактериоидами, которые располагаются по отдельности или группами. Именно на стадии бактериоидов происходит фиксация молекулярного азота [Кретович, 1987; Звягинцев и др., 2005]. В сформировавшемся клубеньке бактериоиды не растут, и вся энергия идет на азотфиксацию [Лысак, 2007; Сидорова и др., 2010]. Способность к симбиотической азотфиксации определяется у клубеньковых бактерий тремя свойствами: специфичностью, вирулентностью и активностью.

Бактеризация только активными штаммами не обеспечит хорошую азотфиксацию, если вирулентность данного штамма недостаточна. Под вирулентностью подразумевается не только способность клубеньковых

бактерий проникать в корни, но и приживаться, и размножаться в них, а также вызывать образование клубеньков у растения-хозяина [Шеманова, Олейников, 1971].

Активность (эффективность) клубеньковых бактерий определяет их способность ассимилировать молекулярный азот в бобово-ризобийном симбиозе. В почве могут быть штаммы эффективные и неэффективные, а также переходные между ними. Заражение бобовых растений эффективными штаммами клубеньковых бактерий способствует активной фиксации атмосферного азота. При заражении неэффективными штаммами клубеньки образуются, но фиксации азота не происходит. Эффективность ризобий способна изменяться под давлением факторов внешней среды [Громов, Павленко 1989].

Важную роль в фиксации атмосферного азота играют поверхностные полисахариды бактерий, которых известно четыре типа. Одним из них являются липополисахариды [Ardourel et al., 1994].

Липополисахариды формируют внешний слой наружной мембраны и поступают в бактериальное микроокружение в составе липополисахарид-белковых и полисахарид-липидных комплексов. Вследствие достаточно большой клеточной оболочки, ризобии содержат большее количество ЛПС, по сравнению с другими грамотрицательными бактериями [MacKenzie et al., 1973].

1.3. Структура липополисахаридов

Липополисахариды – структурные компоненты мембран грамотрицательных бактерий (*Yersinia pestis*, *Salmonella typhi*, *Escherichia coli*, *Rhizobium*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Treponema pallidum*, *Borrelia recurrentis*), поддерживающие стабильность мембраны. Липополисахариды широко изучены в области микробиологии, биохимии, иммунологии и генетики, так как они играют значительную роль в качестве фактора вирулентности грамотрицательных бактерий и являются мощными активаторами врожденного иммунного ответа [Man-Kupisinskaa et al., 2016].

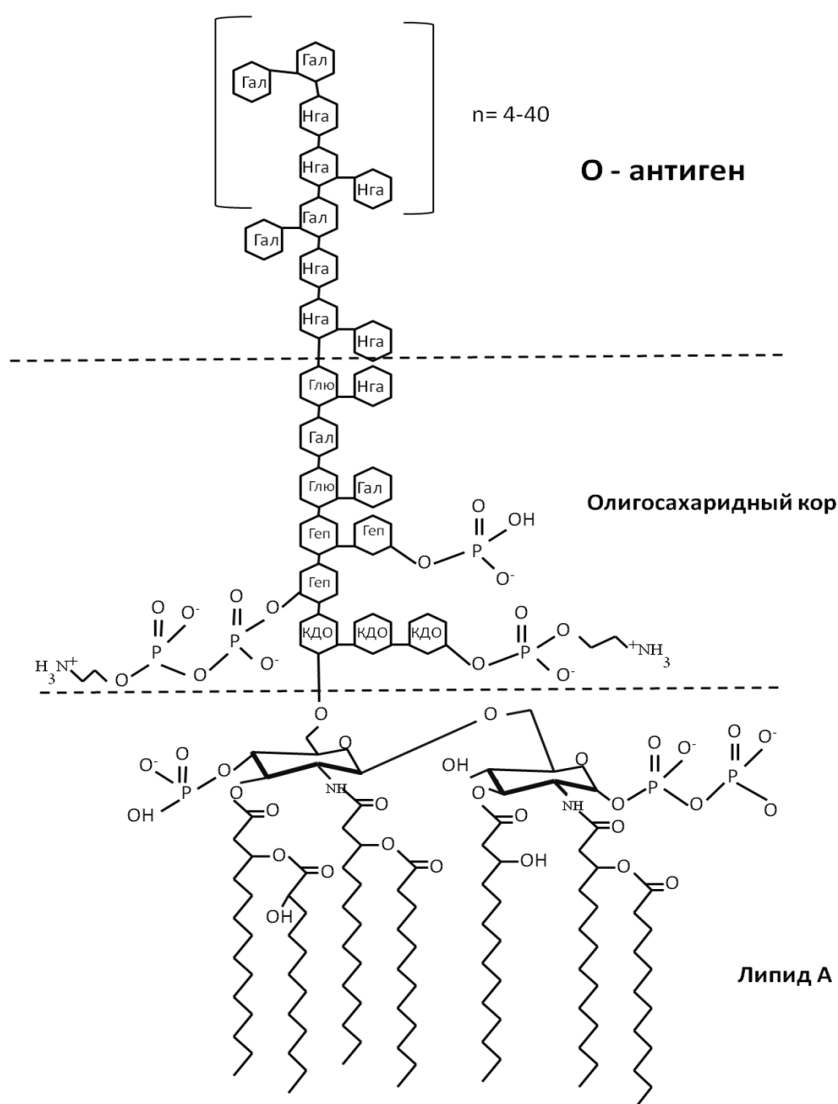


Рисунок 1. Химическая структура липополисахарида из *E. coli* [Ohno and Morrison, 1989].

Молекула ЛПС является гликолипидом и состоит из трёх доменов: липида А, центрального олигосахарида (кора) и О-специфической полисахаридной цепи (О-ПС). Все три домена различны как по происхождению, так и по антигенным и биохимическим свойствам. Липид А является наиболее консервативным участком молекулы ЛПС и проявляет свойства эндотоксина. О-полисахаридная цепь обладает свойствами О-антигена и определяет бактериальную сероспецифичность (серовар) [Маркина, 2013].

Олигосахарид кора связывает липид А с О-полисахаридом. Кор у многих бактерий содержит внутреннюю, примыкающую к липиду А, и внешнюю, граничащую с О-ПС, части. Внутренняя часть олигосахарида кора состоит из 2-3 остатков КДО и 2-3 гептозных остатков (L-глицеро-D-манно-гептоза) и является достаточно консервативным участком ЛПС в пределах одного вида. Внешняя часть олигосахарида состоит из 5-6 21 различных сахаров [Amor et al., 2000] и именно различия в её структуре вносят основной вклад в вариабельность кора.

О-полисахарид связан с терминальным углеводом внешней части олигосахарида кора и направлен в сторону окружающей среды. Он является наиболее вариабельным фрагментом ЛПС и представляет собой регулярный гомо- или гетерополимер, часто разветвленный, построенный из повторяющихся олигосахаридных (от двух до шести остатков моносахаридов) или моносахаридных звеньев. Длина О-полисахарида может варьировать от одного звена в SR-формах до 50 повторяющихся звеньев (в основном 10-20) в S-формах [Muller-Loennies et al., 2007]. В силу высокой вариабельности (среди компонентов полисахарида насчитывают более 100 различных моносахаридов) О-антиген содержит большое количество эпитопов, экспонированных на поверхности клеток и обладающих высоким потенциалом антигенной активности (иммуногенности) [Pollack, 1999].

Липид А является гидрофобным участком имеющим огромное значение для функциональной и структурной целостности наружной мембраны грамотрицательных бактерий. Кроме этого он ответственен за многообразие эндотоксических свойств ЛПС, которые защищают бактерии от действия желчных кислот и пищеварительных ферментов при проникновении в организм хозяина.

Появление в кровотоке ЛПС свидетельствует о присутствии бактерий в организме. Процесс распознавания макроорганизмом бактериальных ЛПС представляет собой комплексное действие [Chin et al., 2006]. ЛПС проявляют разнонаправленный токсический характер. Эффекты действия зависят от концентрации эндотоксина. Так, при малых концентрациях эндотоксин активирует развитие иммунного ответа. При умеренной концентрации ЛПС происходит запуск системы комплимента, клеток макрофагально-моноцитарной системы, стимуляция прокоагулянтной активности, синтеза интерлейкинов, интерферонов, фактора некроза опухолей. Однако дальнейшее повышение количества ЛПС при выраженной недостаточности локального иммунного ответа может представлять опасность для жизни человека вследствие активации мононуклеарных клеток в сторонних органах инфицированного организма [Wynn et al., 2010, Chu, 2011; Eralp et al., 2011]. Подобный ответ становится причиной прогрессирующей системной воспалительной реакции, развитием септического шока и нередко летальным исходом [Kitchens, 2000; Ziaja, 2012].

Принципиальное сходство молекул ЛПС различных грамотрицательных бактерий определяет отсутствие каких-либо патогенетических отличий в клинике эндотоксинемий, развивающихся после гибели бактерий в кровотоке [Поздеев, 2010].

Жирные кислоты (ЖК) – важные структурные элементы липида А, определяющие его гидрофобность. Характерной особенностью изолированного липида А является его гетерогенность, обусловленная

присущей ему неоднородностью химического состава и строения формирующих его жирных кислот [Игнатов и др., 2009].

Химический состав липополисахарида *Sinorhizobium meliloti* был проанализирован много раз, но их структура до сих пор известна лишь частично. В составе наблюдается высокое содержание кислых сахаров - галактуроновой кислоты, глюкуроновой кислоты. Анализ ЛПС из *S. meliloti* штамма 102F51 показал содержание ДНА (3-дезокси-2-гептулосаровой кислоты), которая считается одним из компонентов О цепи и может быть также в составе внешнего ядра [Russa R.,et al,1991].

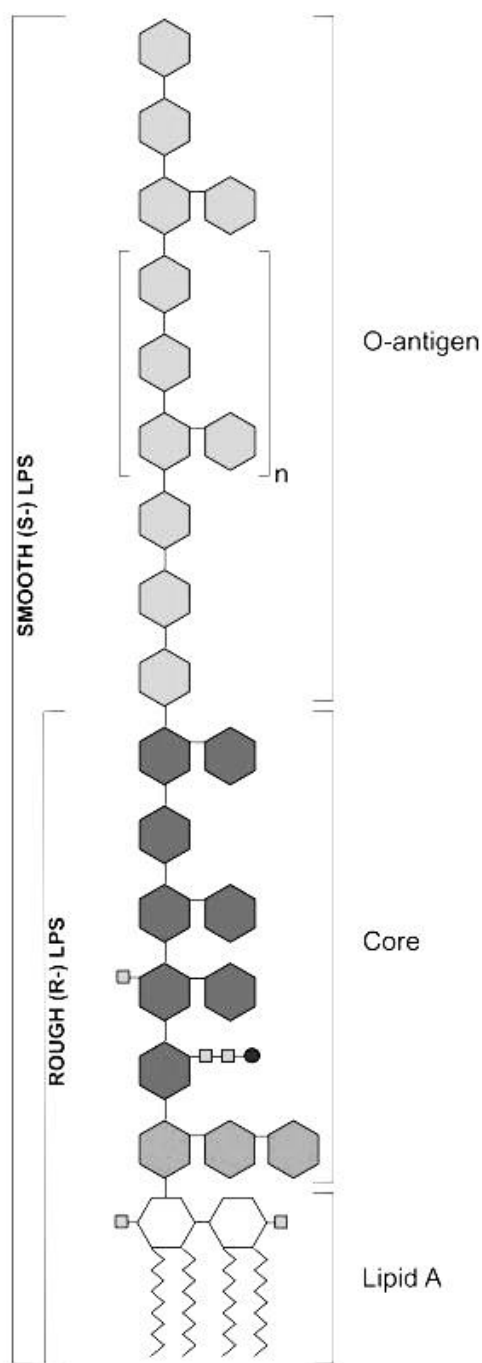


Рисунок 2. Общая схема структуры ЛПС *Sinorhizobium meliloti*.

Также на основе исследования данного штамма был сделан вывод о содержании двух типов ЛПС – ЛПС I и ЛПС II. Но для всех *Sinorhizobium* характерна структура ЛПС II [Kannenberg E.L., et al, 1998]. Общая структура ЛПС *Sinorhisobium* одина со структурой липополисахарид других грамотрицательных бактерий. Основу составляют – липид А, коровая часть, О-антиген (Рис. 2).

Липид А *S. meliloti* состоит из глюкозамина с двумя фосфатными и четырьмя ацильными группами (Рис. 3). Но есть черта, которая отличает их липид А от липидов других энтеробактерий: наличие длинной жирной цепи – 27-оксиоктакозановой кислоты [Poinsot V., et al, 2012], а также отсутствие фосфатной группы, часть молекулы бета-оксибутирила (3-ОНС4: 0), и жирных ацильных остатков, присоединенных к проксимальному остатку GlcN [Choma A. and Sowinski P., 2004].

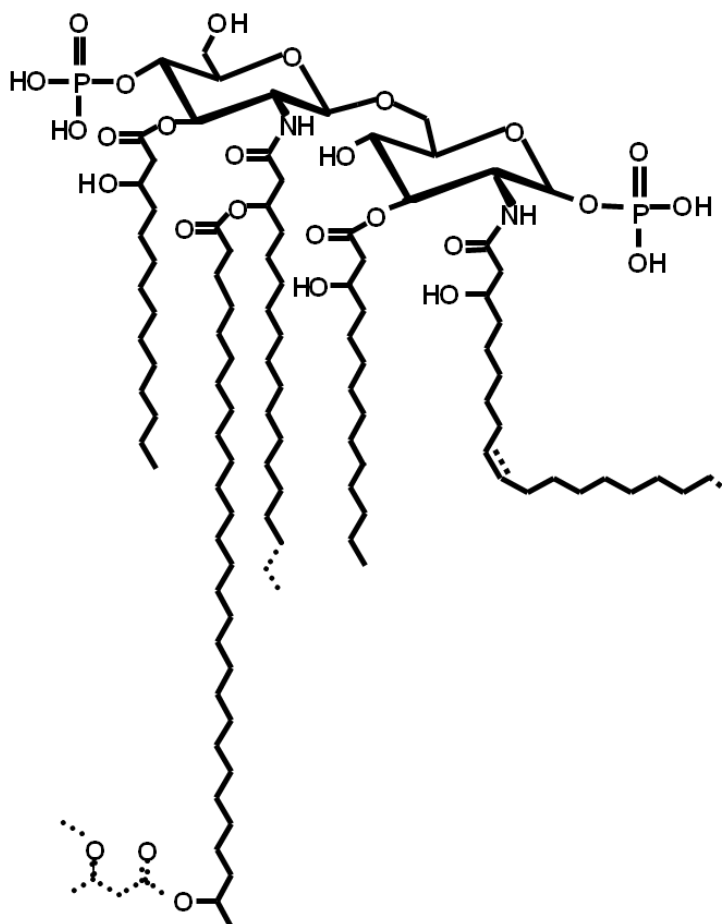


Рисунок 3. Общая структура липида А *S. meliloti*.

По данным рентгеноструктурного анализа, жирные кислоты липида А ориентированы в одном направлении и находятся в плотной гексагональной упаковке. Высокая упорядоченность делает структуру липида А стабильной в конформационном отношении, что является

важным условием проявления его свойств и поведения ЛПС во внешней мембране клеточной оболочки.

Липид А имеет один и тот же эндотоксиновый эффект на макроорганизмы, что и липид А энтеробактерий. Также липид способствует взаимодействию бактерий с клетками растений [Sharypova L.A., et al, 2003].

Кор ЛПС необходим для нормальной жизнедеятельности бактерий. Данная часть существенна для проявления биологических свойств липида А, например, митогенности. Данное свойство связано с увеличением подвижности углеводородных цепей липида в присутствии кора. Вследствие чего облегчается получение и стабилизация биологически активной конформации [Кокоулин М.С., 2014].

О-цепи содержат иммунодетерминантные структуры, против которых нарабатываются антитела при инфекции или иммунизации [Зубова С.В., 2006].

Из-за высокой степени ацилирования жирных кислот липида А, наличия в коровой части остатков сильно ацетилованных О-полисахаридных цепей ЛПС *Sinorhizobium* отличаются гидрофобным характером [Carrion M., et al., 1990].

1.4. Методы анализа липополисахаридов

В настоящее время с развитием научного прогресса на первый план вышли инструментальные методы анализа на основе современных физико-химических методов. Среди них выделяют целый ряд методов, которые применяют для изучения липополисахаридов.

1.4.1. Высокоэффективная жидкостная хроматография

Жидкостная хроматография (ЖХ) - метод разделения и анализа сложных смесей веществ, в котором подвижной фазой является жидкость. Подвижная фаза в жидкостной хроматографии выполняет двоякую функцию: 1) обеспечивает перенос десорбированных молекул по колонке (подобно подвижной фазе в газовой хроматографии); 2) регулирует константы равновесия, а, следовательно, и удерживание в результате взаимодействия с неподвижной фазой (сорбируясь на поверхности) и с молекулами разделяемых веществ. В ЖХ природа подвижной фазы имеет существенно большее значение [Шаповалова, Пирогов, 2007].

Для высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) разработан и выпускается широкий ассортимент сорбентов. Чаще всего применяют чистые силикагели и силикагели с привитыми неполярными и полярными группами. Разработаны и продолжают разрабатывать сорбенты на основе оксидов алюминия, циркония, титана [Яшин, 2003].

Причин развития ВЭЖХ несколько. Прежде всего, следует назвать большой диапазон молекулярных масс веществ, с которыми можно работать: от нескольких единиц до десятков миллионов. Кроме того, мягкость условий ВЭЖХ (почти все разделения можно проводить при температурах, близких к комнатной, при отсутствии контакта с воздухом) делает ее особенно пригодным, а зачастую единственным методом исследования лабильных соединений, в частности, биологически активных веществ и биополимеров. Скорость анализа методом ВЭЖХ высокая:

обычно разделение сложной смеси занимает несколько минут. Метод ВЭЖХ дает возможность препаративно выделить из сложной смеси в мягких условиях чистые вещества, которые можно далее исследовать другими физико-химическими методами. Наконец, чувствительность, достигаемая в ВЭЖХ, в ряде случаев превосходит чувствительность в тонкослойной хроматографии, а высокоселективные детекторы позволяют определять микроколичества веществ в сложных смесях.

По механизму разделения анализируемых или разделяемых веществ ВЭЖХ делится на адсорбционную, распределительную, ионообменную и эксклюзионную. В адсорбционной хроматографии разделение веществ, входящих в смесь и движущихся по колонке в потоке растворителя, происходит за счет их различной способности адсорбироваться и десорбироваться на поверхности адсорбента с развитой поверхностью, например, силикагеля. В распределительной ВЭЖХ разделение происходит за счет разной растворимости разделяемых веществ в неподвижной фазе, как правило, химически привитой к поверхности неподвижного носителя, и подвижной фазе — растворителе. В ионообменной хроматографии молекулы веществ смеси, диссоциировавшие на катионы и анионы в растворе, разделяются при движении через сорбент, на поверхности которого привиты катионные или анионные центры, способные к обмену с ионами анализируемых веществ за счет их разной скорости обмена. В эксклюзионной (ситовой, гельпроникающей, гельфилтрационной) хроматографии молекулы веществ разделяются по размеру за счет их разной способности проникать в поры носителя. При этом первыми выходят из колонки наиболее крупные молекулы (наибольшей молекулярной массы), способные проникать в минимальное число пор носителя. Последними выходят вещества с малыми размерами молекул, свободно проникающие в поры сорбента.

Сегодня ВЭЖХ представляет собой хорошо оформленный инструментальный метод, который широко применяют в самых различных

областях науки и техники. Особенно велико его значение в таких важнейших областях, как биохимия, молекулярная биология, контроль загрязнений окружающей среды, а также в химической, нефтехимической, пищевой и фармацевтической промышленности [Стыскин, и др., 1986].

Также неоднократно показано, что ВЭЖХ является отличным методом для очистки от ЛПС. Гидрофобные липидные группы обеспечивают эффективное связывание с неподвижной фазой ВЭЖХ-сорбентов. Более того десорбция ЛПС наступает только при существенных концентрациях органического модификатора в подвижной фазе [Yasaka 1994, Li 2004].

Однако со временем ЛПС могут накапливаться на сорбенте, что приводит к их элюции вместе с продуктом, возможно, из-за вытеснения последним ЛПС с занятых ими активных центров сорбента. Т.е. сорбент необходимо периодически депирогенизировать, промывая подвижной фазой, включающей гидроксид натрия или уксусную кислоту. Подвижная фаза с крайними значениями pH может негативно отразиться на работоспособности и сроке эксплуатации сорбента. Это, конечно, ограничивает использование ВЭЖХ для очистки от ЛПС.

1.4.2. Ядерный магнитный резонанс (ЯМР)

Спектроскопия ядерного магнитного резонанса (ЯМР) – один из основных методов физико-химического анализа, используемый для однозначной идентификации структуры молекул, исследования внутримолекулярных движений, межмолекулярных взаимодействий в растворах и полимерных цепочках.

Спектроскопия ЯМР используется для исследования структуры биомолекул, в частности, белков и других полимеров. В 1980-е годы началось внедрение методов ЯМР-томографии в медицину для диагностики состояния внутренних органов.

При помощи ЯМР-спектроскопии в определенных условиях можно регистрировать взаимодействие между атомными ядрами через электромагнитное излучение от них, возникающее в сильном однородном магнитном поле. При этом наблюдаются переходы между разными энергетическими состояниями определенных атомных ядер, которые у свободных молекул вырождены. Так как приложенное к ядру атома магнитное поле может быть усилено или ослаблено под влиянием индуцированных магнитных вторичных полей электронов, то протоны последовательно вступают в резонансное взаимодействие с разным электронным окружением.

Также, с помощью метода ЯМР можно построить молекулу липополисахарида бактерии *E.coli*, используя при этом липид и углеводно-силовые поля [Wu et al., 2013]. Так, результаты моделирования показывают, что повышение молекулярной длины ЛПС оказывает влияние на структуру, динамику и свойства двухслойных ЛПС, а терминальные остатки в ЛПС более гибкие и вытянуты вдоль мембраны.

Спектроскопия ЯМР развивалась как один из эффективных и многосторонних методов определения строения химических соединений. Это проявилось в области органической химии, где удалось использовать метод для определения структуры молекул. На основе двух параметров: химического сдвига и спин-спинового взаимодействия, можно с высокой точностью определять химическое окружение отдельных атомов в молекуле. Для достижения высокого спектрального разрешения используются спектрометры с магнитными полями большей напряженности.

По чувствительности ЯМР-спектроскопия уступает другим спектроскопическим методам, это объясняется малой разницей энергией между антипараллельной (против поля) и параллельной (по полю) ориентацией спинов ядер в магнитном поле, что приводит к низкой разности заселенностей, определяющей чувствительность. Для повышения

чувствительности необходима высокая концентрация вещества [Бёккер, 2009].

Главным преимуществом ЯМР в сравнении с другими видами спектроскопии является возможность преобразования и видоизменения ядерного спинового гамильтониана по воле экспериментатора практически без каких-либо ограничений и подгонки его под специальные требования решаемой задачи.

Проведение экспериментов по ЯМР сводится к следующему. Исследуемый образец помещают в постоянное магнитное поле, которое создается постоянным магнитом. При этом на образец подается радиочастотное излучение, обычно метрового диапазона. Резонанс детектируется соответствующими радиоэлектронными устройствами, обрабатывается ими и выдается в виде спектрограммы, которая может быть выведена на осциллограф или самописец, в виде ряда цифр и таблиц, получаемых при помощи печатающего устройства.

Вследствие этого, метод спектроскопии ЯМР признан ключевым физико-химическим методом исследования липополисахаридов, поскольку практически все, как структурные, так и конфигурационные различия между их компонентами, оказывают влияние на резонансную частоту ядер и, следовательно, находят отражение в спектрах ЯМР. Таким образом, этот метод дает не только исчерпывающую информацию о первичной структуре цепи полимера, но и о конформационных свойствах липополисахаридов в водных растворах.

1.4.3. МАЛДИ-масс-спектрометрия

Метод матрично-активированной лазерной десорбции/ионизации (МАЛДИ) был разработан и опробован для анализа природных высокомолекулярных соединений в середине 1980 годов.

В основе метода МАЛДИ лежит способность ряда органических соединений возгоняться при пониженном давлении при поглощении

электромагнитного излучения видимого или ультрафиолетового диапазона высокой интенсивности. Такие вещества выполняют функцию матрицы. Источником же электромагнитного излучения является лазер, что отражено в названии метода.

Для успешного проведения анализа необходимо правильно выбрать растворитель, матрицу и подобрать соотношение между матрицей и анализируемым веществом. Чем выше молекулярная масса анализируемого вещества, тем больше матрицы нужно использовать. Выбор растворителя также имеет большое влияние на результат масс-спектрометрического анализа. Очень важно, чтобы кристаллизация матрицы и анализируемого вещества проходила одновременно, сопровождаясь встраиванием молекул анализируемого вещества в кристаллы матрицы, что является необходимым условием получения хорошо разрешимого спектра.

Необходимо отметить, что МАЛДИ разрабатывался как метод мягкой ионизации для лабильных высокомолекулярных биоорганических молекул, склонных к фрагментации. При десорбции под действием лазера молекулы матрицы поглощают излучение; за счет поглощенной энергии происходит локальный разогрев и испарение вещества с частичной фрагментацией и ионизацией молекул матрицы. Отмеченная мягкость ионизации является основным достоинством метода, определяющим область его применения [Гришин, 2014].

Применительно к ЛПС, некоторую сложность в анализе ЛПС представляет амфифильный характер молекул. Однако, не смотря на это, масс-спектр МАЛДИ даёт данные по структуре липида А непосредственно из очищенных липополисахаридов без каких-либо дополнительных химических манипуляций [Sturiale et al., 2011].

1.4.4. Инфракрасная (ИК) спектроскопия

Инфракрасная (ИК) спектроскопия является одним из основных методов анализа органических соединений. Современная ИК-спектроскопия представляет собой экспресс-метод установления структурных особенностей органических соединений. С помощью ИК-спектроскопии быстро и надёжно идентифицируются разнообразные функциональные группы: карбонильная, гидроксильная, карбоксильная, амидная, амина, циано и др.; а также различные непредельные фрагменты: двойные и тройные углерод-углеродные связи, ароматические или гетероароматические системы. Методами ИК-спектроскопии изучают внутри- и межмолекулярные взаимодействия, например, образование водородных связей. В химии древесины и химии природных соединений с помощью ИК-спектроскопии исследуют структуры углеводов, лигнинов, аминокислот, терпенов, стероидов и многих других веществ.

Инфракрасным излучением называют излучение с длинами волн от 0.5 до 1000 мкм. В ИК-диапазоне проявляются переходы между колебательными и вращательными уровнями энергии молекул. Химические связи в молекулах испытывают колебательные движения. Колебательная энергия молекул квантована, т.е. поглощаемая энергия изменяется не непрерывно, а скачкообразно. В результате колебательный (инфракрасный) спектр молекулы представляет собой ряд пиков (полос поглощения), отвечающих разным колебательным энергетическим переходам. Большинство колебательных переходов в молекулах органических соединений реализуется в диапазоне длин волн λ от 2.5 до 25 мкм. В единицах волновых чисел $\nu = 1/\lambda$ (см⁻¹), величин обратных длинам волн, этот интервал составляет 4000-400 см⁻¹. Именно в этом диапазоне волновых чисел осуществляют регистрацию ИК-спектров органических и природных соединений.

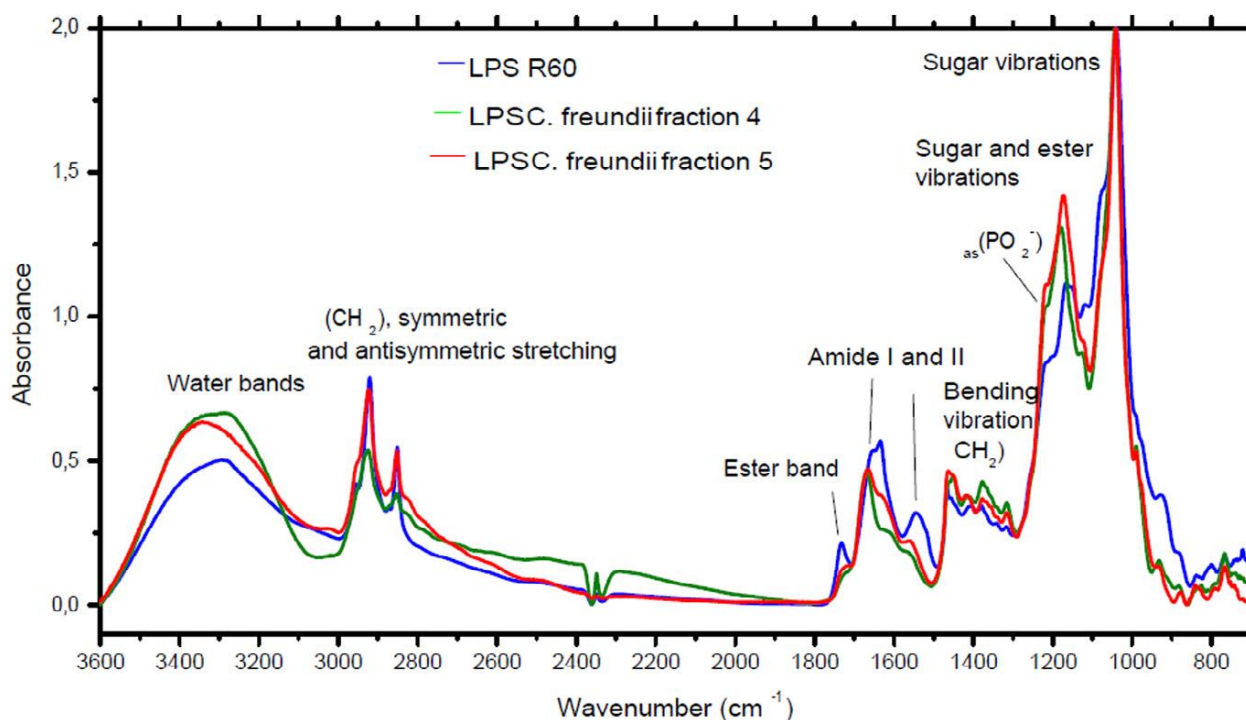


Рисунок 4. Инфракрасный спектр ЛПС *Salmonella minnesota* [Brandenburg et al., 2016].

Современные спектрометры позволяют регистрировать ИК-спектры газообразных, жидких и твердых образцов. Для получения ИК-спектра органического или природного соединения необходимо всего от 1 до 10 мг вещества. Регистрация ИК-спектров осуществляется в кюветах изготовленных из бромида калия KBr или хлорида натрия NaCl – материалов, не поглощающих ИК-излучение в исследуемом диапазоне. ИК-спектры принято записывать в виде зависимости пропускания ИК-излучения (%) от волнового числа $\nu = 1/\lambda$ (см-1). Поэтому максимумы пиков, отвечающие наибольшему поглощению ИК-излучения, обращены вниз.

В большинстве случаев ИК-спектры органических и природных соединений регистрируют либо в виде растворов веществ в хлороформе CHCl₃, четыреххлористом углероде CCl₄, сероуглероде CS₂, либо в виде твердых прозрачных таблеток, полученных прессованием под давлением мелко размолотой смеси вещества с бромидом калия. Иногда используют

метод съёмки ИК-спектра вещества в виде мелко растертой суспензии в вазелиновом или минеральном масле.

В случае регистрации ИК-спектров соединений в растворах или суспензиях необходимо вычитать полосы поглощения растворителей или суспендирующей среды. При интерпретации ИК-спектров веществ, полученных в растворах в CHCl_3 и CCl_4 , нужно учитывать, что в зонах собственного поглощения этих растворителей отнесение линий спектра может быть неоднозначным.

При регистрации ИК-спектров органических и природных соединений часто наблюдаются линии поглощения примесей в образцах. Обычно это сигнал воды около 3450 см^{-1} , колебания диоксида углерода (как примеси из атмосферы) при $2360\text{--}2325\text{ см}^{-1}$. Иногда образцы загрязнены силиконовыми смазками, имеющими полосы при 1625 см^{-1} и $1100\text{--}1000\text{ см}^{-1}$, или фталатами, проявляющимися в виде пика 1725 см^{-1} . Следует помнить, что кюветы для ИК-спектроскопии, изготовленные из KBr и NaCl, чувствительны к воздействию следов воды и со временем мутнеют и выходят из строя. Поэтому, необходимо тщательно сушить образцы и растворители перед съёмкой ИК-спектров [Васильев и др. 2007].

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Наращивание биомассы.

В свежеприготовленную проавтоклавированную среду YM производили посев культуры *Sinorhizobium meliloti* с помощью бактериальной петли методом укола. Засеянные колбы с жидкой питательной средой (по 500мл) помещали в шейкер-инкубатор при +28°C. Проводили данную процедуру пять раз. Затем решено было посеять на твердую агаризованную среду YM. После посева инкубировали при той же температуре до завершения экспоненциальной фазы роста.

Осаждение культуры *Sinorhizobium*.

Полученную среду с микробной биомассой разливали в центрифужные пробирки на 50 мл. Центрифугировали на 3500 об/мин в течение 20 мин при 4°C. Затем сливали надосадочную жидкость, оставшийся в пробирках осадок бактериальной культуры заливали 30 мл 1%-ного раствора NaCl и вновь центрифугировали при 3500 об/мин в течение 20 мин при 5°C. Затем надосадочную жидкость сливали, осадок использовали далее для выделения липополисахаридов.

Разрушение бактериальных клеток.

После инкубирования клеточную массу центрифугировали. Полученный осадок с каждой культуры подвергали ультразвуковой дезинтеграции во льду (Bioruptor Standard UCD 200) в течение 15 минут с перерывом по 30 сек.

Экстракция липополисахаридов.

Осуществляли водно-фенольным методом по Вестфалю с незначительными изменениями [Westphal et al., 1952]. К массе разрушенных микробных клеток приливали равный объем фенола, затем

пробирку интенсивно перемешивали в течение 20 мин. Далее центрифугировали при 4000 об/мин при 4°C 30 мин. Аккуратно (не задевая интерфазу) отбирали водную фазу в чистую пробирку. Данную процедуру проводили дважды. Полученный водный раствор очищали от нуклеиновых кислот.

Очистка препарата липополисахаридов от нуклеиновых кислот.

Проводилась с помощью спиртовой экстракции. К водному раствору добавляли три объёма абсолютного этанола и инкубировали при -20°C в течение 16 часов. Осаждение нуклеиновых кислот с помощью центрифугирования при 5000 об/мин при 4°C в течение 30 мин. Надосадочную жидкость использовали для хроматографической очистки препарата ЛПС.

Очистка и фракционирование ЛПС.

Очистка и фракционирование липополисахаридных компонентов осуществлялись методом жидкостной колоночной хроматографии. В качестве неподвижной фазы выступали силикагель (производство Macherey-Nagel, 60-200 mesh) и оксид алюминия (производство Sigma). Подвижной фазой служили водно-органические смеси ацетон-этанол-вода с добавкой триэтиламина (до 1% v/v). Элюцию осуществляли в градиентном режиме – от начальной 100%-ной органической до конечной 100%-ной водной фазы. Дискретно отбирали по 20 мл элюата, после чего фракции оставляли упариваться в ламинарном боксе. Полученные сухие образцы далее анализировали. Подбор элюэнта проводили с помощью тонкослойной хроматографии. Использовали смеси растворителей ацетон, этанол, вода в разных соотношениях.

Инструментальные методы анализа.

Анализ полученных препаратов проводили с помощью ЯМР и ИК – спектроскопии. Ядерную магнитную резонансную спектроскопию осуществляли с помощью прибора ЯМР-спектрометр Bruker AM 300 (Bruker, Германия) с рабочей частотой 300 МГц. Образцы растворяли в дейтериевой воде. ИК-спектроскопия проводилась на приборе Nicolet 6700 (Thermo Electron, США) с использованием приставки НПВО. Для элементного анализа использовался CHNS-анализатор Euro3000 (Hekatech, Германия).

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Липополисахариды представляют повышенный интерес для исследователя главным образом с точки зрения иммунологии. Получение и очистка большого количества природного ЛПС необходимо как для исследовательских задач (выяснение молекулярного механизма индукции ЛПС инфекционно-токсического шока), так и для создания на основе ЛПС иммуномодулирующих препаратов [Chicoine et al., 2007; Alizadeh et al., 2010]. Молекула ЛПС состоит из бифосфорилированного липида (липид А) и гидрофильного полисахарида. Полисахаридная часть состоит из двух отличных областей: олигосахаридного ядра, содержащего 10-12 сахаров и полисахаридных повторяющихся цепей, формирующих О-специфические цепи – О-антигены (О-Аг). Ядро ковалентно связано кислыми сахарами с липидом А.

Так как молекула ЛПС имеет свои химические особенности, актуальным является поиск способов выделения фракции нативных ЛПС с высокой фармакологической активностью. Невозможно выделить индивидуальные ЛПС, в виду того, что в биопрепаратах их фракции представлены соединениями близкими по физико-химическим характеристикам. Но можно выделить однородные фракции, которые могли бы удовлетворять фармакологическим требованиям.

В качестве микроорганизма-источника ЛПС была использована культура азот-фиксирующих почвенных бактерий *Sinorhizobium meliloti*. Наращивание проводили на жидкой питательной среде YM при 22°C с постоянным покачиванием до значения оптической плотности OD₆₀₀ 0,6.

Процесс получения препаратов ЛПС схематично представлен на рисунке 5.

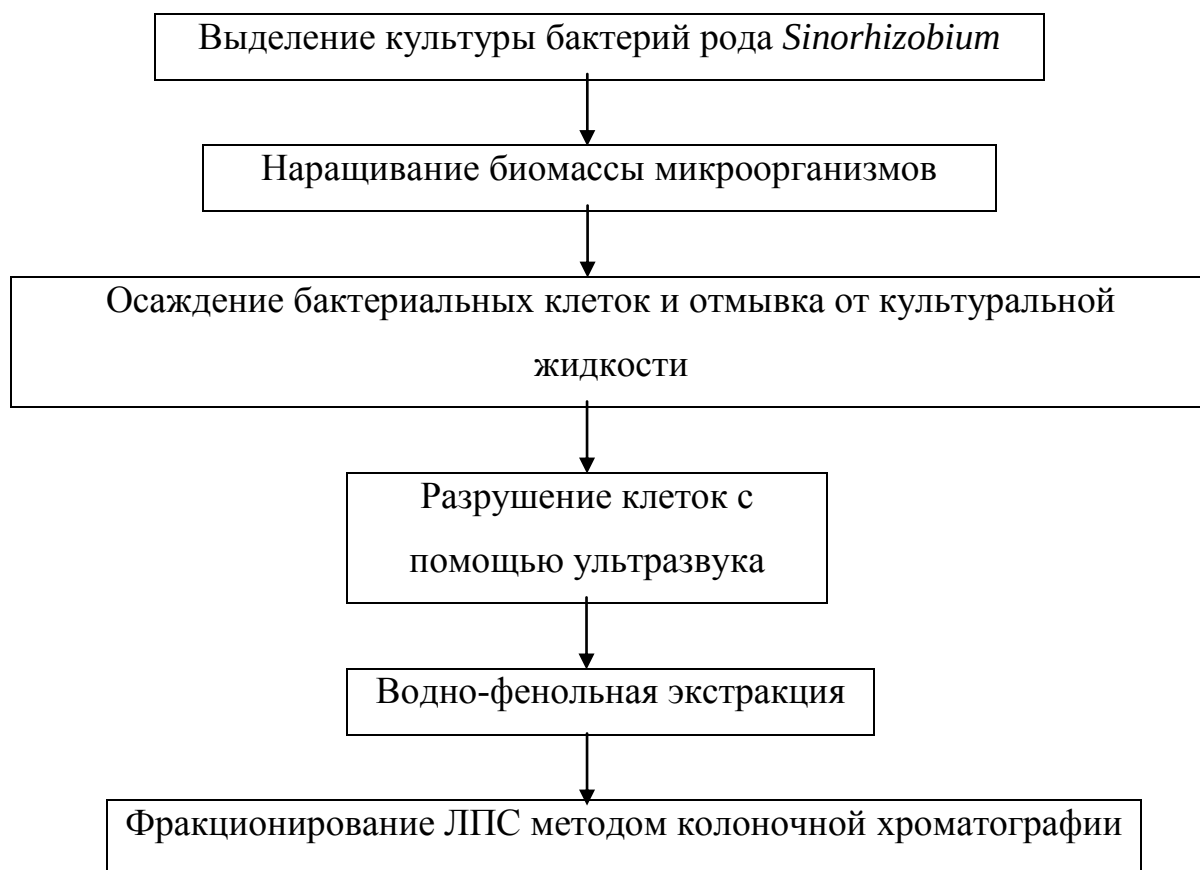


Рисунок 5. Схема получения ЛПС из бактерий *Sinorhizobium meliloti*.

В ходе оптимизации условий разрушения бактериальной стенки нами было установлено, что наиболее пригоден вариант разрушения клеточной стенки бактерий с помощью ультразвука на льду. Этот метод был выбран в виду отсутствия загрязняющих конечный продукт веществ.

ЛПС выделяли по методу Вестфалья с незначительными изменениями [Westphal et al., 1952]. Суспензия разрушенных клеток обрабатывалась 45%-ным горячим водным раствором фенола, водную фазу, содержащую ЛПС, отбирали для выделения ЛПС.

Фракционирование полученной после экстракции смеси осуществлялось жидкостной колоночной хроматографией в несколько этапов (рис. 6).

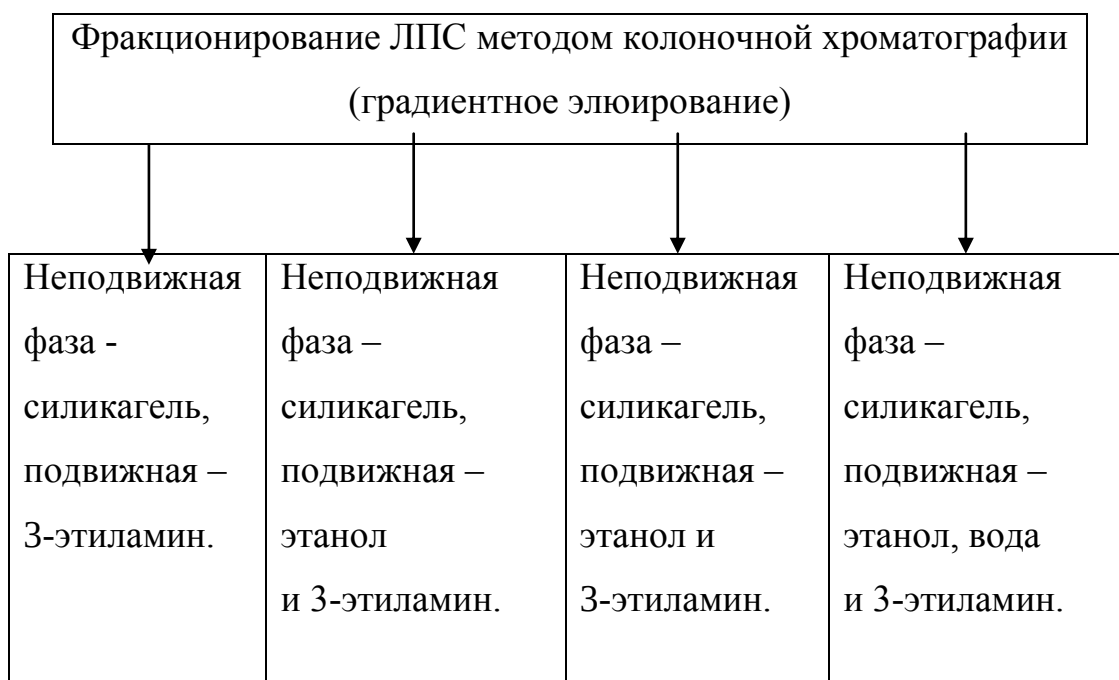


Рисунок 6. Способы фракционирования.

Мы предположили, что разделяемая смесь, помимо молекул ЛПС, содержит еще и возможные продукты их распада (остатки жирных кислот, олигосахаридные фрагменты), а также фенол, остающийся после экстракции (о его наличии можно судить по характерному запаху). В связи с этим, элюцию проводили с постепенным повышением полярности подвижной фазы. В начале, после уравнивания колонки смесью ацетон/триэтиламин (последний регулирует кислотность буферной среды), вносили концентрированный спиртовой раствор ЛПС.

После внесения спиртового раствора ЛПС, мы добавляли первый элюент – смесь органических растворителей, содержащих 70% ацетона, 29% этанола и 1% триэтиламина. Это позволило нам вымыть из колонки слабополярные соединения, такие как фенол и остатки жирных кислот.

Второй элюент повышает полярность подвижной фазы, поскольку в его состав входит 96% этанола и 1% триэтиламина. Это основной элюент, под действием которого удаётся добиться концентрированного выхода ЛПС в течение 30-40 мл (1-2 фракции).

Собранные спиртовые фракции пассивно упаривались в течение нескольких дней при комнатной температуре. В результате были получены либо не имевшие цвета, либо слабо-окрашенные в светло-жёлтый цвет нитевидные кристаллы. Они хорошо растворялись в воде и 70% этаноле.

Для исключения нуклеиновых кислот в выделенных препаратах ЛПС был проведен гель-электрофорез препаратов ЛПС и осадка, полученного на этапе осаждения этанолом (рис. 7). При окрашивании геля бромистым этидием проявлялись светящиеся зоны, однозначно указывающие на наличие ДНК (не входит в гель) и РНК (мелкие фрагменты, входящие в гель) для осадка и полное отсутствие таковых в дорожках, соответствующих ЛПС.

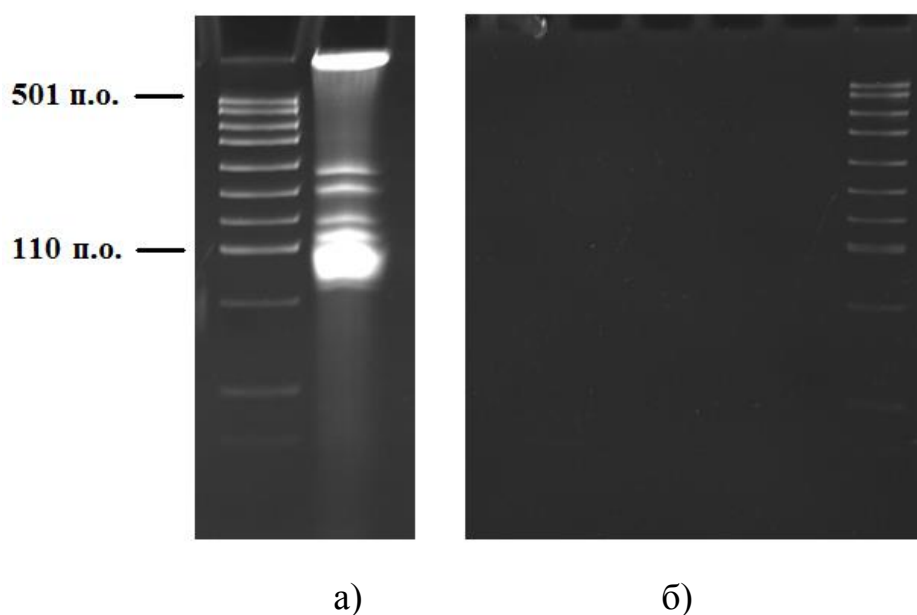


Рисунок 7. Электрофореграммы: а) НК-содержащего осадка, б) фракций ЛПС после колоночного разделения.

Полученные фракции, с целью подтверждения их принадлежности к липополисахаридам, были проанализированы далее инструментальными методами анализа такими, как ЯМР-спектроскопия, ИК-спектроскопия.

В ИК-спектрах, которые для всех фракций оказались схожи по сигналам, мы наблюдали характеристичные полосы, соответствующие колебаниям связей С-С и С-Н. Особенно интересным оказалось наличие

полосы, характерной для фосфатной группы, т.о., ЛПС синоризобий фосфорилированы.

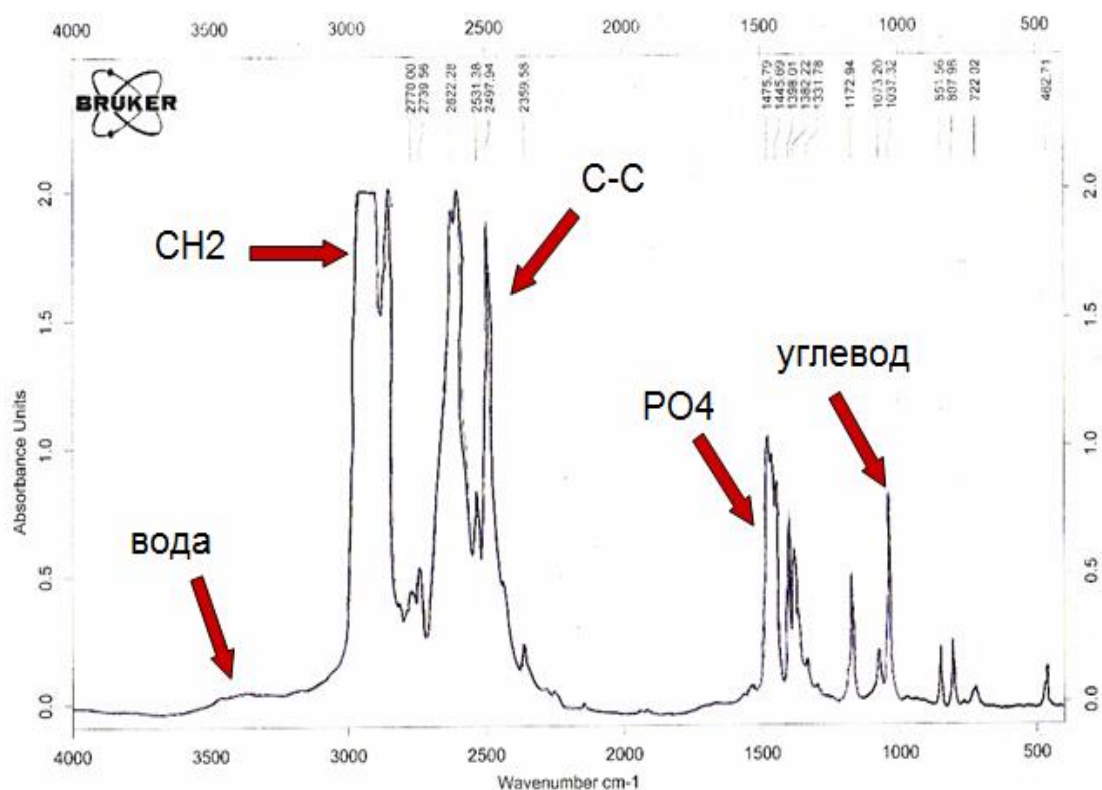


Рисунок 8. ИК-спектр ЛПС.

ЯМР-анализ показал, что в спектре ЛПС присутствуют характерные сигналы протонов углеводных остатков (4.8 м.д.), CH₂-групп, сопряженных с полярными фрагментами (3.2 м.д.) и углеводородных цепей жирных кислот (1.3 м.д.) (рис.9). Это свидетельствует о том, что полученные препараты являются молекулами ЛПС.

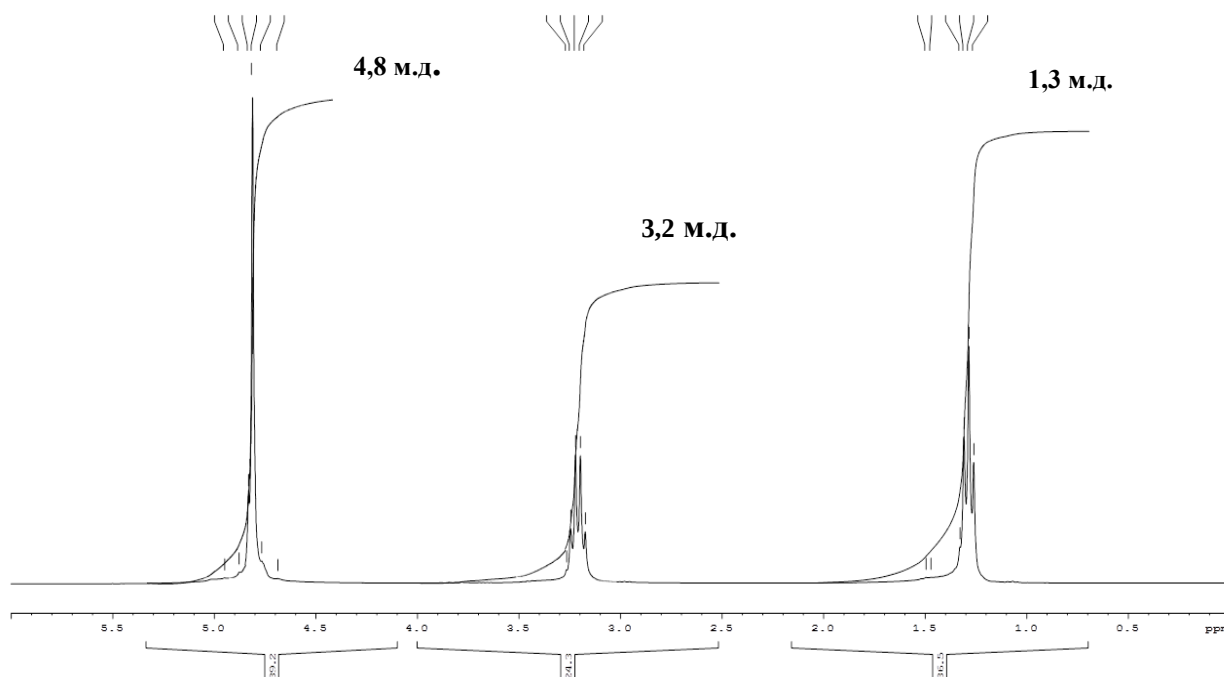


Рисунок 9. ЯМР-спектр ЛПС.

Спектры ЯМР для всех фракций оказались схожи по сигналам, но несколько различались по интегральной интенсивности пиков (табл. 2). Поскольку в ЯМР-спектрах для всех фракций ЛПС имелись сигналы протонов жирнокислотных остатков (группа III), к их количеству мы привели интенсивности сигналов протонов других групп.

Таблица 1.

Соотношение количества атомов водорода в разных фракциях ЛПС.

№	Группа протонов	Интенсивность сигнала			Отношение I/III (для L3)
		L1	L2	L3	
I	-CH (углевод)	35	39	52	1,44
II	-CH ₂ OH (полярные)	23	24	24	0,67
III	-CH ₂ (неполярные)	36	36	36	-

В результате оказалось, что наименее редуцированной по углеводному фрагменту, т.е. наименее разрушенной, является фракция III. Для дальнейшей работы был найден также коэффициент корреляции - отношение интенсивностей сигналов протонов I и III групп.

Элементный анализ, проведенный только для фракции L3, подтвердил содержание в молекуле ЛПС фосфора, хотя данный элемент не является обязательным компонентом, а также показал очень высокое содержание азота. Предположив, что одна молекула ЛПС может содержать 6 жирнокислотных остатков, мы произвели дальнейший расчет относительно углеводной части молекулы.

Таблица 2.

Результаты элементного анализа.

Элемент	С	Н	О	N	Р
Содержание элементов, %	50,74	4,18	33,40	10,17	1,51
Соотношение элементов	87	86	43	15	1
Число атомов в липиде А	102	180	12		-
Число атомов углеводных остатков (с учетом коэффициента корреляции)	312	260	286		-
Σ число атомов	414	440	298		5

В результате, согласно нашим расчетам, ЛПС фракции L3 содержит около 50 углеводных остатков, из которых: 2 приходятся на липид А, около 15 приходятся на коровую часть и около 33 приходятся на О-антиген. При этом количество фосфатных групп оказалось равным 5.

Таким образом, данные физико-химических методов анализа позволяют идентифицировать полученные субстанции как препараты ЛПС.

ВЫВОДЫ:

1. Методом жидкостной колоночной хроматографии выделены три условные фракции липополисахарида *Sinorhizobium meliloti*. ЯМР- и ИК-спектры всех трех фракций оказались идентичны по характеристичным сигналам. Однако для спектров ЯМР Н1 наблюдались различия в величинах интегральной интенсивности сигналов протонов, что свидетельствует о разной молекулярной структуре полученных фракций.
2. Данные ЯМР Н1 и элементного анализа позволили определить приблизительную молекулярную структуру ЛПС фракции L3. Оказалось, что молекулы ЛПС данной фракции содержат 5 фосфатных групп, около 50 углеводных остатков, из которых 2 приходятся на липид А, около 15 - на коровую часть и около 33 - на О-антиген. Наблюдалось аномально высокое содержание атомов азота в структуре ЛПС, которые, вероятно, представлены аминогруппами углеводных остатков. Детальная структура ЛПС *Sinorhizobium meliloti* требует дальнейшего изучения.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Антипчук А.Ф., Косенко Л.В. Влияние липополисахаридов и глюканов двух штаммов *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* на формирование и эффективность их симбиоза с растениями гороха // Микробиология. 2004. Т. 73. № 1. С. 62-67.
2. Бёккер.Ю. Спектроскопия. М.: Техносфера. 2009. 528с.
3. Бойко А.С., Смолькина О.Н., Федоненко Ю.П., Здоровенко Э.Л., Качала В.В., Коннова С.А., Игнатов В.В. Особенности структуры О-полисахаридов азоспирилл серогруппы I // Микробиол. 2010. Т. 79. № 2. С. 219-227.
4. Бондаренко В.М., Гильцбург А.Л., Лиходед В.Г. Микробный фактор и врожденный иммунитет в патогенезе атеросклероза // М.-Тверь:ООО «Издательство «Триада». 2013. С. 17-20.
5. Васильев А.В., Гриненко Е.В., Щукин А.О., Федулина Т.Г.. Инфракрасная спектроскопия органических и природных соединений // Учебное пособие. СПб.: СПбГЛТА. 2007. 54 с.
6. Варбанец Л.Д., Здоровенко Г.М., Книрель Ю.А. Методы исследования эндотоксинов // Киев, Наукова думка. 2006. 237 с.
7. Гришин И.Д. Времяпролетная масс-спектрометрия с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией для анализа высокомолекулярных и металлоорганических соединений // Электронное учебно-методическое пособие. - Нижний Новгород: Нижегородский госуниверситет. 2014. 49 с.
8. Громов Б.В., Павленко Г.В. Экология бактерий // Л.: Изд-во ленинградского ун-та. 1989. 248 с.
9. Дентовская С.В., Шайхутдинова Р.З., Книрель Ю.А.. Конструирование вакцинных штаммов грамотрицательных бактерий со сниженной реактогенностью // Мол. генетика. 2006. № 2. С. 3-10.

10. Доросинский Л. М. Бактериальные удобрения – дополнительное средство повышения урожая // М.: Россельхозиздат. 1965. 171 с.
11. Емцев В.Т., Мишустин Е.Н. Микробиология: учебник для вузов // 2005. Изд. 5-е. М.: Дрофа. 445 с.
12. Звягинцев Д.Г., Бабьева И.П., Зенова Г.М. Биология почв: учебник // 2005. Изд. 3-е. М.: Изд-во МГУ. 445 с.
13. Игнатов В.В., Коннова О.Н., Бойко А.С.. Характеристика состава жирных кислот липидов А липополисахаридов бактерий рода *Azospirillum* // Известия Саратовского университета. Серия Химия. Биология. Экология. 2009. Т. 9. № 1. С. 23-27.
14. Кадерамс И.Г. Формирование фотосинтетического и симбиотического аппаратов растений и их вклад в повышение продуктивности агроценозов гороха посевного (*Pisum sativum* L.) // Экология. Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук. 2014. Омск.
15. Коннова О.Н., Бурыгин Г.Л., Федоненко Ю.П. и др. Химический состав и иммунохимическая характеристика липополисахарида азотфиксирующих ризобактерий *Azospirillum brasilense* Cd // Микробиология. 2006. Т. 75. № 3. С. 383–388.
16. Карцова А.А. Жидкостная хроматография в медицине // Соросовский образовательный журнал. 2000. Т. 6. №11.
17. Косенко, Л.В., Затовская Т.В. Изучение липополисахаридов *Sinorhizobium meliloti* СХМ1-188 и двух его мутантов, характеризующихся сниженной нодуляционной конкурентоспособностью // Микробиология. 2004. Т. 73. N 3. С. 350-357.
18. Кретович В.Л. Усвоение и метаболизм азота у растений // М.: Наука. 1987. 488 с.
19. Лебедев А.Т. Масс-спектрометрия в органической химии // Москва. Бином. 2003. 496 с.

20. Лысак В. В. Микробиология: учебное пособие // Микс: БГУ. 2007. 426 с.
21. Маркина А.А. Липополисахаридная кандидат-вакцина для профилактики эндотоксического и септического шока // Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологической степени. Москва. 2013.
22. Нифантьев И.Э., Ивченко П.В. Практический курс спектроскопии ядерного магнитного резонанса. Методическая разработка // Москва. 2006.
23. Нолтинг Б. Новейшие методы исследования биосистем // Москва. Техносфера. 2005. 256 с.
24. Пинегин Б.В. Принципы применения иммуномодуляторов в комплексном лечении инфекционных процессов // Ж-л «Лечащий врач». 2000. № 8. С. 88-93.
25. Поздеев О.К. Молекулярно-генетические основы патогенности энтеробактерий // Практическая медицина. 2010. № 4. С. 34-37.
26. Руденко Б.А., Руденко Г.И. Высокоэффективные хроматографические процессы // М.: Наука. 2002.
27. Сигида Н., Федоненко Ю.П., Чернышева М.П., Гринев В.С., Коннова С.А., Игнатов В.В.. Характеристика состава липополисахарида галотолерантных бактерий *Azospirillum Halopraeferens* E. // Известия Саратавского университета. Новая серия. Серия Химия. Биология. Экология. 2014. Т. 14, выпуск 3.
28. Сидорова К.К., Шумный В.К., Власова Е.Ю., Глянченко М.Н., Мищенко Т.М., Майстренко Г.Г. Симбиогенетика и селекция микросимбионта на повышение азотфиксации на примере гороха (*Pisum Sativum* L.) // Вести. ВОГиС. 2010. Т. 14. № 2. С. 357-374.
29. Спайнк Г., Кондроши А., Хукас П. *Rhizobiaceae* молекулярная биология бактерий взаимодействующих с растениями // СПб. 2002.

30. Стыскин Е.Л., Ициксон Л.Б., Брауде Е.В. Практическая высокоэффективная жидкостная хроматография // М.: Химия. 1986. 288 с.
31. Тахистов В.В., Пономарёв Д.А. Органическая масс-спектрометрия // СПб.: ВВМ. 2005. 346 с.
32. Федоненко Ю.П., Бойко А.С., Здоровенко Э.Л., Коннова С.А., Шашков А.С., Игнатов В.В., Книрель Ю.А. Структурные особенности О-специфических полисахаридов бактерий *Azospirillum* серогруппы III // Биохимия. 2011. Т. 76, № 7. С. 976–982.
33. Хаитов Р.М., Пинегин Б.В. Иммуномодуляторы: классификация, фармакологическое действие, клиническое применение // Ж-л ревматология, иммунология, аллергология. 2004. № 7. с. 53–57.
34. Харитонов Ю.Я. Количественный анализ. Физико-химические (инструментальные) методы анализа // Аналит. Химия в 2-х томах. 2003. № 2. 559с.
35. Шаповалова Е.Н., Пирогов А.В. Хроматографические методы анализа // Методическое пособие для специального курса. Москва. 2007.
36. Шеманова Н.М., Олейников Н.М. Об активности и вирулентности клубеньковых бактерий фасоли // Новое в изучении биологической фиксации азота. М. : Наука. 1971. С. 116–124.
37. Якименко М.В. Изменение свойств клубеньковых бактерий сои родов *Bradyrhizobium* и *Sinorhizobium* амурской селекции под воздействием экологических факторов // Диссертация. 2006. 149 с.
38. Яшин Я.И., Яшин А.Я.. Высокоэффективная жидкостная хроматография. Состояние и перспективы // Рос. химический журнал. 2003. т. XLVII, № 1.
39. Alizadeh D., Zhang L., Brown C.E., Farrukh, O., Jensen, M. C., Badie, B. Induction of anti-glioma natural killer cell response following multiple low-dose intracerebral CpG therapy // Clin. Cancer. Res. 2010. V. 16. P. 3399–3408.

40. Amor K., Heinrichs D.E., Frirdich E., Ziebell K., Johnson R.P., Whitfield C. Distribution of core oligosaccharide types in lipopolysaccharides from *Escherichia coli* // *Infect. Immun.* 2000. V. 68. P. 1116-1124.
41. Ardourel M., Demont N., Debellé F., Maillet F., de Billy F., Promé J.C., Truchet G. *Rhizobium meliloti* lipooligosaccharide nodulation factors: different structural requirements for bacterial entry into target root hair cells and induction of plant symbiotic developmental responses // *The Plant Cell.* 1994. V. 6. No. 10. P. 1357-1374.
42. Bhattacharyya P.N., Jha D.K. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture // *World J. Microb. Biot.* 2012. V. 28. P. 1327–1350.
43. Brandenburg K., Heinbockel L., Correa W., Fukuoka S., Gutschmann T., Zahringer U., Koch M.H.J. Supramolecular structure of enterobacterial wild-type lipopolysaccharides (LPS), fractions thereof, and their neutralization by Pep19-2.5 // *Journal of Structural Biology.* 2016. V. 194. P. 68-77.
44. Brozek K.A., Raetz C.R. Biosynthesis of lipid A in *Escherichia coli*. Acylcarrier protein-dependent incorporation of laurate and myristate // *J. Biol. Chem.* 1990. V. 265, No. 26. p. 110-117.
45. Chen W.X., Han G.H., Li J.L. Numerical taxonomic study of fast-growing soybean rhizobia and a proposal that *Rhizobium fredii* be assigned to *Sinorhizobium* // *gen. nov. Int. J. Syst. Bacteriol.* 1988. V.38. P. 392-397.
46. Chicoine M.R., Zahner M., Won E.K., Kalra, R. R., Kitamura, T., Perry, A., Higashikubo, R. The in vivo antitumoral effects of lipopolysaccharide against glioblastoma multiforme are mediated in part by toll - like receptor 4 // *Neurosurgery.* 2007. V. 60. P. 372–380.
47. Chin A.C., Flynn A.N., Fedwick J.P. The role of caspase-3 in lipopolysaccharide-mediated disruption of intestinal epithelial tight junctions // *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 2006. V. 84. P. 143-150.
48. Chu, A.J. Tissue factor, blood coagulation, and beyond: an overview // *Int. J. Inflamm.* 2011. V. 2011. P. 367284.

49. Crow V.L., Jarvis B. ID. W., Greenwood R.M.. Deoxyribonucleic acid homologies among acid-producing strains of *Rhizobium* // Int. J. Syst. Bacteriol. 1981. V. 31. P. 152-172.
50. Wu E.L., Engstrom O., Jo S., Stuhlsatz D., Yeom M.S., Klauda J.B., Widmalm G., Im W. Molecular Dynamics and NMR Spectroscopy Studies of E. Coli Lipopolysaccharide Structure and Dynamics // Biophysical Journal 2013. V. 105. P. 1444–1455.
51. Eralp, O., Yilmaz, Z., Failing, K., Moritz, A., Bauer, N. Effect of experimental endotoxemia on thrombelastography parameters, secondary and tertiary hemostasis in dogs // Journal of Veterinary Internal Medicine. 2011. V. 25(3). P. 524–531.
52. Fedonenko Y.P., Konnova O.N., Zatonsky G.V., Shash-kov A.S., Konnova S.A., Zdorovenko E.L., Ignatov V.V., Knirel Y.A. Structure of the O-polysaccharide of the lipopolysaccharide of *Azospirillum irakense* KBC1 // Carbohydr. Res. 2004. V. 339. P. 1813–1816.
53. Ferreira L., Sa'nchez-Juanes F., Garcí'a-Fraile P., Rivas R., Mateos P.F., Martí'nez-Molina E., Gonza'lez-Buitrago J.M., Vela'zquez E. MALDI-TOF Mass Spectrometry Is a Fast and Reliable Platform for Identification and Ecological Studies of Species from Family Rhizobiaceae // 2001. V. 6. P. 1-3.
54. Larrouy-Maumus G., Clements A., Filloux A., McCarthy R.R., Mostowy S. Direct detection of lipid A on intact Gram-negative bacteria by MALDI-TOF mass spectrometry // Journal of Microbiological Methods. 2015. V. 120. P. 68-71.
55. Kitchens, R.L. Role of CD14 in cellular recognition of bacterial lipopolysaccharides // Chem. Immunol. 2000. V. 74. P. 61–82.
56. Li Y., Lander R., Manger W., Lee A. Determination of lipid profile in meningococcal polysaccharide using reversed-phase liquid chromatography // J. Chromatogr. B. 2004. V.804. P.353-358.
57. Lindon J. Encyclopedia of Spectroscopy and Spectrometry // — 2nd Ed. — Academic Press. 2010.

58. MacKenzie C. R., Vail W. J., Jordan D. C. Ultrastructure of free-living and nitrogen-fixing forms of *Rhizobium meliloti* as revealed by freeze-etching // Journal of bacteriology. 1973. V. 113. P. 387-393.
59. Man-Kupisinskaa A., Bobkoa E., Gozdiewiczza T.K., Maciejewska A., Jachymek W., Lugowski C., Lukasiewicz J. Fractionation and analysis of lipopolysaccharide-derived oligosaccharides by zwitterionic-type hydrophilic interaction liquid chromatography coupled with electrospray ionisation mass spectrometry // Carbohydrate Research. 2016. P. 2-6.
60. Margaret I., Lucas M.M, Acosta-Jurado S., Buendí'a-Claverí'a A.M., Fedorova E., Hidalgo A., Rodriguez-Carvajal M.A., Rodriguez-Navarro D.N., Ruiz-Sainz J.E., Vinardell J.M. The *Sinorhizobium fredii* HH103 Lipopolysaccharide is not only relevant at early soybean nodulation stages but also for symbiosome stability in mature nodules // 2013. V. 8. P. 1-3.
61. Muller-Loennies S, Brade L, Brade H. Neutralizing and cross-reactive antibodies against enterobacterial lipopolysaccharide // International Journal of Medical Microbiology 2007. V. 297. No.5. P. 321-340.
62. Ohno N., Morrison D.C. Lipopolysaccharide interaction with lysozyme: binding of lipopolysaccharide to lysozyme and inhibition of lysozyme enzymatic activity // J Biol Chem. 1989. V. 264. P. 4434–4441.
63. Pollack M. Biological functions of lipopolysaccharide antibodies. In: Endotoxin in health and disease // New York. Marcel Dekker. 1999. P. 623-629.
64. Sturiale L., Palmigiano P., Silipo A., Knirel Y.A., Anisimov A.P., Lanzetta R., Parrilli M., Molinaro A., Garozzo D. Reflectron MALDI TOF and MALDI TOF/TOF mass spectrometry reveal novel structural details of native lipooligosaccharides // Published online in Wiley Online Library. September. 2011.
65. Wedlock, D.N., Jarvis, B.D.W. DNA homologies between *Rhizobium* and *Bradyrhizobium* species // Int. J. Syst. Bacteriol. 1986. V. 36. P. 550-580.

66. Westphal, O., Luderitz, O., Bister, F. Concerning extraction from bacteria with phenol/water // Z. Naturforsch. Teil B. 1952. V. 7. P. 148–155.
67. Wilkinson S.G. Bacterial lipopolysaccharides – themes and variation // Prog. Lipid Res. 1996. V. 35. No. 3. P. 283-343.
68. Wynn, J., Cornell, T.T., Wong, H.R., Shanley, T.P., Wheeler, D.S. The host response to sepsis and developmental impact // Pediatrics. 2010. V. 125(5). P. 1031–1041.
69. Yasaka Y., Tanaka M. Labeling of free carboxyl groups // J. Chromatogr. B. 1994. V.659. P.139-143.
70. Ziaja, M. Sepsis and septic encephalopathy: characteristics and experimental models // Folia Neuropathol. 2012. V. 50(3). P. 231–239.

Справка о проверке на Антиплагиат студенки МБ401 Пинчак Надежды Васильевны

Уважаемый пользователь!

Обращаем ваше внимание, что система Антиплагиат отвечает на вопрос, является ли тот или иной фрагмент текста заимствованным или нет. Ответ на вопрос, является ли заимствованный фрагмент именно плагиатом, а не законной цитатой, система оставляет на ваше усмотрение. Также важно отметить, что система находит источник заимствования, но не определяет, является ли он первоисточником.

Информация о документе:

Имя исходного файла: ПРОВЕРКА2.doc

Имя компании: Башкирский государственный медицинский университет

Тип документа: Прочее

Имя документа: Диплом Пинчак

Текстовые статистики:

Индекс читаемости: сложный

Неизвестные слова: в пределах нормы

Макс. длина слова: в пределах нормы

Большие слова: выше нормы

Оригинальные блоки: 78.51%

Заимствованные блоки: 21.49%

Заимствование из "белых" источников: 0%

Итоговая оценка оригинальности: **78.51%**



Отзыв о прохождении дипломной практики

студентки 4 курса

медико-профилактического факультета с отделением микробиологии

ГБОУ ВПО БГМУ Минздрава России

Пинчак Надежды Васильевны по теме:

«АНАЛИЗ СТРУКТУРЫ ЛИПОПОЛИСАХАРИДОВ БАКТЕРИЙ РОДА
SINORHIZOBIUM».

Студентка Пинчак Н.В. выполняла научно-исследовательскую работу в рамках дипломной практики в лаборатории физико-химических методов анализа биополимеров ИБГ УНЦ РАН. В процессе выполнения дипломной работы Пинчак Н.В. проработала значительный объем литературных источников, в том числе посвященных использованию инструментальных методов анализа для изучения биомолекул, что выходит за рамки традиционных образовательных дисциплин медицинских вузов. За время прохождения практики она зарекомендовала себя как исполнительный и ответственный работник. Пинчак Н.В. приобрела навыки работы с электронными базами данных научной литературы, освоила ряд микробиологических и аналитических (инструментальных) методов исследования.

Считаю, что результат дипломной практики Пинчак Н.В. заслуживает отличной оценки.

Научный руководитель:

Зав. лаб., к.б.н.



Р.Р. Гарафутдинов

РЕЦЕНЗИЯ

на дипломную работу студентки 4 курса обучения
медико-профилактического факультета с отделением микробиологии
ГБОУ ВПО БГМУ Минздрава России
Пинчак Надежды Васильевны.

На рецензию представлена дипломная работа на тему «Анализ структуры липополисахаридов бактерий рода *Sinorhizobium*».

Дипломная работа Пинчак Н.В. имеет следующую структуру: введение, литературный обзор, описание материалов и методов исследований, представление собственных данных и их обсуждения, выводы, список использованной литературы, приложения.

Поставленная автором цель во введении, была достигнута.

В результате была установлена молекулярная структура ЛПС бактерий *Sinorhizobium meliloti*, а также проведен их анализ с помощью инструментальных методов.

Дипломная работа Пинчак Н.В. удовлетворяет всем требованиям, предъявляемым к дипломным работам, может быть допущена к защите и заслуживает отличной оценки.

Рецензент
д.б.н., профессор кафедры
фундаментальной и
прикладной микробиологии

Баймиев Ал.Х.



РЕЦЕНЗИЯ

на дипломную работу студентки 4 курса обучения
медико-профилактического факультета с отделением микробиологии
ГБОУ ВПО БГМУ Минздрава России
Пинчак Надежды Васильевны
по теме: «Анализ структуры липополисахаридов бактерий рода
Sinorhizobium».

Дипломная работа Пинчак Н.В. построена по традиционной схеме, включает введение, литературный обзор, описание объектов и методов исследований, представление собственных данных и их обсуждения, заключение, выводы, список использованной литературы, приложения. Во введении четко сформулированы цель и задачи исследования, показаны актуальность и научная новизна работы. Литературный обзор достаточно широко освещает состояние изучаемой проблемы. В главе, посвященной результатам исследования, изложены основные итоги проделанной работы.

Поставленные автором задачи исследования решены в полной мере. Так, были получены несколько фракций ЛПС, проведен их анализ. Наиболее интересным представляется результат по установлению молекулярной структуры ЛПС бактерий *Sinorhizobium meliloti*.

Считаю, что дипломная работа Пинчак Н.В. удовлетворяет всем требованиям, предъявляемым к дипломным работам, может быть допущена к защите и заслуживает отличной оценки.

Рецензент

Ст. научн. сотр. лаборатории
молекулярной биологии и нанобиотехнологии
ИБГ УНЦ РАН, д.б.н



Б.Р. Кулуев