

ISSN: 2310-6255**Founder:** Academic Publishing House *Researcher***DOI:** 10.13187/issn.2310-6255

Has been issued since 2013.

**European Journal of Molecular Biotechnology**

UDC 615:919 : 57.088

Chitosan-based Matrix, Used to Determine the Bacterial Lipopolysaccharide in Air¹Dmitry M. Frolov²Valery G. Zaitsev

¹Volgograd State University, Russian Federation
Universitetskiy Avenue 100, Volgograd city, 400062
Post-graduate

E-mail: frodm@rambler.ru

²Volgograd State University, Russian Federation
Universitetskiy Avenue 100, Volgograd city, 400062

PhD (Biology), Assistant Professor

E-mail: valeryzaitsev@gmail.com

Abstract. The article describes the technology of chitosan-based matrix creation, and results of the study of its affine properties to bacterial lipopolysaccharide in aerosol dispersion. High degree of deacylation of polymer (over 97%), three-dimensional-porous structure, and multilayer packaging in analytical cartridge were the features of this matrix. Specified air volume, containing aerosol concentration of bacterial lipopolysaccharide, was passed through the glass cylinder with analytical container. The share of captured molecules ranged from 1.0% to 1.5%, demonstrating the efficiency of chitosan matrix. It is suitable for the creation of the devices for bacterial lipopolysaccharide detection in the air, based on the obtained matrix.

Keywords: lipopolysaccharide; air pollutants; chitosan; analytics; biosensors.

Введение. За последние 15-20 лет в биологии и медицине сформировалось представление о роли продуктов бактериального происхождения в воздушной среде в возникновении и развитии хронической патологии органов дыхания человека. Согласно литературным данным, даже малые концентрации липополисахаридов (ЛПС), белков и полиаминов бактериального происхождения, попадая в организм здорового человека, оказывают неблагоприятное воздействие. А если иммунитет снижен и/или имеет место проблемы с дыхательной системы, то подобные продукты могут вызывать различные заболевания легких и других системных органов [1-4].

Экспериментальные исследования крови и ряда внутренних органов свидетельствуют о том, что после ингаляции даже малых доз ЛПС в водно-солевой или гидрофобной аэрозольной дисперсии развивается системная эндотоксинемия [5, 6].

Уже не вызывает сомнений тот факт, что большинство современных производственных, общественных и бытовых помещений оснащены системами очистки и кондиционирования воздуха. При этом согласно многочисленным исследованиям установили, что некоторые микроорганизмы, способны основывать колонии на фильтрах таких устройств. В результате продукты жизнедеятельности бактерий, образовавшиеся в кондиционере или захваченные из окружающей среды, могут поступать в воздух кондиционируемого помещения и накапливаться во взвешенном состоянии. Работники мясокомбинатов, парниковых хозяйств, и ряда подобных предприятий, где неизбежно

попадание бактериального ЛПС в воздушную среду в высоких концентрациях подвергаются именно такому воздействию [7-9]. Все эти эффекты частично объясняют общие негативные последствия длительного воздействия на организм человека воздуха кондиционированных помещений и помещений с высоким содержанием взвешенного ЛПС в промышленности и сельском хозяйстве и диктуют необходимость мониторинга его содержания в воздушной среде.

На сегодняшний день дешевого, скринингового способа анализа воздушной среды различных помещений на содержание ЛПС бактериального происхождения не существует. Поэтому разработка способа и устройства для определения продуктов бактериального происхождения в воздушной среде сможет дополнить гигиенический мониторинг качества воздуха промышленных и жилых помещений и формированию, в итоге, более адекватной среды пребывания человека.

Разрабатываемый метод полуколичественной оценки содержания ЛПС в воздухе основан на использовании природного биополимера, способного образовывать устойчивый с ним комплекс, таким биополимером является хитозан. Взаимодействие ЛПС с хитозаном зависит, главным образом, от отрицательно заряженных групп ЛПС и положительно заряженных аминных групп хитозана. Такая специфическая особенность хитозана нашла себе применение в биофармацевтике и медицине, а так же в пищевой промышленности [10, 11]. При этом взаимодействие хитозана и ЛПС рассматривалось в растворах и определялось ионной силой их заряженных групп [12].

Таким образом, целью работы стал анализ аффинных свойств матрицы на основе хитозана к бактериальному ЛПС, диспергированному в воздушной среде.

Материалы и методы.

Трехмерные пористые монеткообразные матрицы были созданы на кафедре биоинженерии и биоинформатики Волгоградского государственного университета (Россия) на основе коммерческого хитозана производства производства (Pharma Nutrients, США) [13]. Производство матриц включало в себя:

- дополнительную очистку и деацетилирование первичного материала (до 97% и выше) в щелочной бескислородной среде при пониженном давлении; отмывку и медленное обезвоживание в условиях, предотвращающих ороговение;
- ресуспензирование во временном носителе;
- формирование пористой структуры с помощью метода замораживания-высушивания при $-28\text{ }^{\circ}\text{C}$ в емкостях с поглотителем воды в течение 72 часов.

В результате такой последовательности процедур были получены первичные матрицы размером $1 \times 5 \times 5$ мм с регулярным размером пор диаметром 70–150 мкм. Из них методом послойного наложения под небольшим давлением и при увлажнении в стеклянном сосуде создавали многослойные матрицы, пригодные для анализа.

Модельные эксперименты включали в себя исследование аффинных свойств матриц в 5 независимых определениях. Для этого в рециркулирующем режиме диспергировали ЛПС *S. Enteritidis* с помощью аэрозольного компрессора AND CN-231 (Japan), позволяющего получать водно-солевую дисперсию со средним размером частиц 4 мкм, до создания в воздухе концентрации 20 мкг/л. По 100 л такого воздуха пропускали со скоростью 0,5 л/мин через аналитические кассеты, содержащие хитозановые матрицы (опыт) и увлажненное апиrogenное ватное волокно (контроль). В модельных опытах сравнения использовали воздух того же помещения без его предварительного обогащения ЛПС. Все потоки воздуха, поступающего из аналитических кассет, собирали в колбы-ловушки с 25 мл 0,85%-ного раствора хлорида натрия в апиrogenной воде. После пропускания воздуха матрицы из хитозана и ватного волокна также помещали в 25 мл апиrogenного 0,85%-ного раствора хлорида натрия и тщательно элюировали. Пробы полученных растворов из колб-уловителей и элюентов исследовали на количественное содержание ЛПС.

Концентрацию ЛПС определяли турбидиметрическим методом с использованием ЛАЛ-реактива Pyrotell-T (Associates of Cape Code inc., USA) на микропланшетном ридере Bio-Rad (iMark, Japan). Итоговые показатели рассчитывались в нг ЛПС/цельный объект.

Обработку количественных данных проводили непосредственно из общей матрицы данных Excel 7.0 (Microsoft, USA) с привлечением возможностей программ Statistica 6.0

(StatSoft Inc., USA) с учетом общепринятых требований для медико-биологических исследований. Для анализа различий между выборками использовали критерий Манна-Уитни.

Результаты и их обсуждение. Результаты исследования концентрации ЛПС в 25 мл раствора элюента волокна с хитозаном и без, а также в колбе-ловушке представлены в таблице.

Таблица

Количество ЛПС (нг) в расчете на цельный объект исследования в опытах по изучению аффинности матрицы на основе хитозана

Проба	Эксперимент	
	Контроль	Опыт
Основной – в воздухе 20 мкг/л ЛПС		
Задержано матрицей	152 ± 14,3	646 ± 50,8 *
Задержано колбой-уловителем	430 ± 31,7	384 ± 24,0
Сравнение – в воздухе следы ЛПС		
Задержано матрицей	Следы	5,2 ± 1,2 *#
Задержано колбой-уловителем	8,2 ± 1,7 #	3,7 ± 0,9 *#

* - достоверные различия между опытом и контролем;

- достоверные различия между основными испытаниями и сравнением.

Из полученных данных видно, что матрица с хитозаном задерживала в среднем в 4,2 раза больше молекул ЛПС, чем обычный ватный фильтр. Расчет эффективности захвата ЛПС, диспергированного в воздухе, хитозаном показал, что матрица задерживает примерно 1,2% от общего числа молекул ЛПС. Подобный расчет, в виде коэффициента можно использовать в аналитической части устройства для детекции ЛПС в воздушной среде.

Данные исследования свойств хитозана все больше убеждают в значительном потенциале этого природного полимера. Его уникальные свойства можно использовать в разных сферах человеческой деятельности. Наш эксперимент показал, что хитозан является неплохим претендентом для его применения в биотехнологическом производстве биосенсорных систем. Известно, что взаимодействие ЛПС с хитозаном зависит главным образом от отрицательно заряженных групп ЛПС и положительно заряженных аминных групп хитозана [12]. Поэтому для увеличения его аффинности и специфичности связывания с ЛПС можно прибегнуть к модификации хитозанового полимера [14]. Модифицированный хитозан с повышенной эффективностью может стать основой для хемораспознающего слоя биосенсорной матрицы.

Рабочий макет устройства выглядит следующим образом. Воздушный поток поступает в воздухозаборник аппарата, затем проходит через аффинную матрицу, где и происходит сорбция ЛПС (первичный сигнал). За счет высокой аффинности матрицы к ЛПС, она способна захватывать из воздушного потока даже малые концентрации ЛПС. Образование комплекса [ЛПС - матрица] сопровождается изменением её физико-химических свойств (вторичный сигнал). Полученный вторичный сигнал регистрируется и преобразуется в выходной сигнал, на основании которого можно будет судить о содержании ЛПС бактериального происхождения в воздушной среде (рис.).

При разработке рабочей схемы устройства для детекции бактериального ЛПС был определен ряд технических требований, необходимых для его эффективной работы. При моделировании аффинной матрицы должны учитываться следующие требования:

1. Матрица должна быть высокоаффинна к бактериальному ЛПС.
2. Матрица должна образовывать с ЛПС устойчивый комплекс.

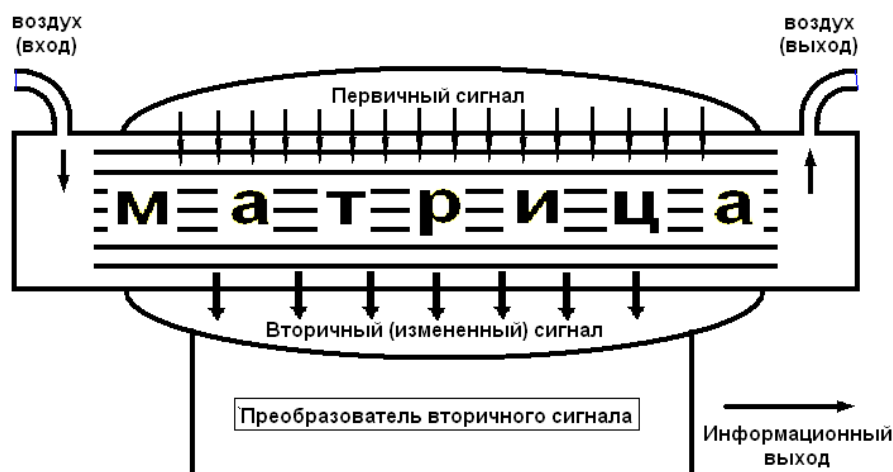


Рисунок. Рабочая схема устройства для определения бактериального ЛПС в воздушной среде

3. Изменение физико-химических свойств матрицы должно быть достаточно специфичным и значительным по амплитуде, чтобы улавливаться детектором вторичного сигнала.

С помощью разработанного устройства для определения продуктов бактериального происхождения появляется возможность одномоментного анализа воздушной среды жилых и промышленных помещений на содержание ЛПС, превышающего известный в литературе аналог [15]. Устройство может быть использовано различными службами мониторинга (как внутренними, так и внешними), контролирующими состав воздушной среды промышленных и жилых помещений.

Заключение. Максимально деацетилованный трехмерно-пористый хитозан пригоден для использования в качестве уловителя бактериального ЛПС из воздушной среды, и может являться компонентом аналитических кассет биосенсорных устройств для определения этого токсина в воздушной среде.

Примечания

1. Liebers V, Raulf-Heimsoth M, Brüning T. Health effects due to endotoxin inhalation. *Arch Toxicol.* 2008; 82, pp. 203–210.
2. Gomez-Mejiba S.E., Zhai Z., Akram H., et al. (2009) Inhalation of environmental stressors and chronic inflammation: autoimmunity and neurodegeneration // *Mutat. Res.* 2009. Vol. 674 (1-2). P. 62–72.
3. Cañadas O., Keough K.M.W., Casals C. (2011) Bacterial lipopolysaccharide promotes destabilization of lung surfactant-like films // *Biophys. J.* 100(1), pp. 108–116.
4. Möller W., Heimbeck I., Hofer T.P.J., et al. (2012) Differential inflammatory response to inhaled lipopolysaccharide targeted either to the airways or the alveoli in man. *PLoS One.* 7(4): e33505.
5. Frolov D.M., Alekseenko A.Y., Novochadov V.V. (2012) Structural changes in the lung by aerosolic lipopolysaccharide, dispersed in the hydrophobic and the hydrophilic phase. *Fundamental Research [Fundamental'nye Issledovaniya]*. (10-2), pp. 345-348. [in Rus.]
6. Novochadov V.V., Frolov D.M. (2013) Modeling an acute lung injury by inhalation of lipopolysaccharide-containing ultrafine aerosoles. *Herold Volgograd State Univ. 11: Natural Sciences [Vestnik Volgogradskogo Gosudarstvennogo Universiteta. 11: Estestvennye Nauki]*. (2), pp. 14-21. [in Rus.]
7. Andreau K., Leroux M., Bouharrou A. (2012) Health and cellular impacts of air pollutants: from cytoprotection to cytotoxicity // *Biochem Res Int.* 2012; e493894.
8. Duquenne P. Marchand G., Duchaine C. (2013). Measurement of endotoxins in bioaerosols at workplace: a critical review of literature and a standardization issue. *Ann. Occup. Hyg.* 57 (2), pp. 137–172.

9. Heldal K.K. Barregard L., Larsson P., Ellingsen D.G. (2013) Pneumoproteins in sewage workers exposed to sewage dust. *Int. Arch. Occup. Environ. Health.* 86 (1), pp. 65-70.
10. Muzzarelli, R.A. Biomedical exploitation of chitin and chitosan via mechano-chemical disassembly, electrospinning, dissolution in imidazolium ionic liquids, and supercritical drying / R.A. Muzzarelli // *Mar. Drugs.* – 2011. – Vol. 9, №9. – P. 1510-1533.
11. Zhao J., Han W., Chen H., et al. (2011) Preparation, structure and crystallinity of chitosan nano-fibers by a solid-liquid phase separation technique. *Carbohydr. Polym.* 83, pp. 1541–1546.
12. Sarmiento B., das Neves J. (2012) Chitosan-based systems for biopharmaceuticals : delivery, targeting and polymer therapeutics. *Chichester, West Sussex : John Wiley & Sons*, 556 pp.
13. Lyabin M.P., Semenov P.S. (2011) Improved technology obtaining chitosan. *Herold Volgograd State Univ. 11: Natural Sciences [Vestnik Volgogradskogo Gosudarstvennogo Universiteta. 11: Estestvennye Nauki].* (2), pp. 17-22. [in Rus.]
14. Naberezhnykh G.A. Gorbach V.I., Likhatskaya G.N., et al. (2008) Interaction of chitosans and their N-acylated derivatives with lipopolysaccharide of gram-negative bacteria. *Biochemistry (Mosc).* 2008 Vol. 73 (4). P. 432-41.
15. Baker S., Wiesmann W.P. (2008) Methods of making a chitosan product having an ultra-low endotoxin concentration and the ultra-low endotoxin chitosan product derived therefrom and method of accurately determining inflammatory and anti-inflammatory cellular response to such materials. *Patent application number: 20080248508.* IPC8 Class: AG01N3353FI.

УДК 615:919 : 57.088

Матрица на основе хитозана, пригодная для определения бактериального липополисахарида в воздушной среде

¹Дмитрий М. Фролов

²Валерий Г. Зайцев

¹ Волгоградский государственный университет, Россия

Пр. Университетский, 100, Волгоград, 400062

Аспирант

E-mail: frodm@rambler.ru

² Волгоградский государственный университет, Россия

Пр. Университетский, 100, Волгоград, 400062

Кандидат биологических наук, доцент

E-mail: valeryzaitsev@gmail.com

Аннотация. В статье описана технология создания матрицы на основе биополимера хитозана и результаты исследования ее аффинных свойств к бактериальному липополисахариду в аэрозольной дисперсии. Особенностью матрицы являлось ее повышенная степень деацетилирования полимера (свыше 97%), трехмерно-пористая структура и многослойная упаковка в аналитической кассете. Заданный объем воздушной смеси, содержащей аэрозоль бактериального липополисахарида заданной концентрации, пропускали через стеклянный цилиндр с аналитической кассетой. В результате исследования получили эффективность захвата липополисахарида хитозаном в пределах от 1% до 1,5% от общего числа молекул. Это вполне пригодно для создания на основе полученной матрицы устройства для детекции бактериального ЛПС в воздушной среде.

Ключевые слова: липополисахарид; биоаэрозоли; хитозан; биоаналитика; биосенсоры.