
EUROPEAN  **of Molecular
Journal Biotechnology**

Has been issued since 2013.
ISSN 2310-6255.
2013. Vol.(2). № 2. Issued 4 times a year

EDITORIAL STAFF

Dr. Novochadov Valerii – Volgograd State University, Volgograd, Russia (Editor-in-Chief)
Dr. Goncharova Nadezhda – Research Institute of Medical Primatology, Sochi, Russia

EDITORIAL BOARD

Dr. Malcevschi Alessio – University of Parma, Parma, Italy
Dr. Mathivanan D. – St. Eugene University, Lusaka
Dr. Nefed'eva Elena – Volgograd State Technological University, Volgograd, Russia
Dr. Tarantseva Klara – Penza State Technological University, Penza, Russia

The journal is registered by Federal Service for Supervision of Mass Media, Communications and Protection of Cultural Heritage (Russia). Registration Certificate ПИИ № ФС77-55114 26.08.2013.

Journal is indexed by: **CrossRef** (UK), **EBSCOhost Electronic Journals Service** (USA), **Electronic scientific library** (Russia), **Global Impact Factor** (Australia), **Open Academic Journals Index** (Russia), **ULRICH's WEB** (USA).

All manuscripts are peer reviewed by experts in the respective field. Authors of the manuscripts bear responsibility for their content, credibility and reliability.

Editorial board doesn't expect the manuscripts' authors to always agree with its opinion.

Postal Address: 26/2 Konstitutcii, Office 6
354000 Sochi, Russia

Website: <http://ejournal8.com/>
E-mail: ejm2013@mail.ru

Founder and Editor: Academic Publishing
House *Researcher*

Passed for printing 16.12.13.

Format 21 × 29,7/4.

Enamel-paper. Print screen.

Headset Georgia.

Ych. Izd. l. 4,5. Ysl. pech. l. 4,2.

Circulation 1000 copies. Order № 2.

European Journal of Molecular Biotechnology

2013

№

2

Издается с 2013 г. ISSN 2310-6255.
2013. № 2 (2). Выходит 4 раза в год.

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

Новоцадов Валерий – Волгоградский государственный университет, Волгоград, Россия
(Гл. редактор)

Гончарова Надежда – Научно-исследовательский институт медицинской приматологии РАН, Сочи, Россия

РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ

Малкевски Алессо – Университет города Парма, Парма, Италия

Мативанан Д. – Университет Санкт Евген, Лусака, Замбия

Нефедьева Елена – Волгоградский государственный технический университет, Волгоград

Таранцева Клара – Пензенский государственный технологический университет, Пенза

Журнал зарегистрирован Федеральной службой по надзору в сфере массовых коммуникаций, связи и охраны культурного наследия (Российская Федерация). Свидетельство о регистрации средства массовой информации ПИ № ФС77-55114 от 26.08.2013 г.

Журнал индексируется в: **CrossRef** (Великобритания), **EBSCOhost Electronic Journals Service** (США), **Global Impact Factor** (Австралия), **Научная электронная библиотека** (Россия), **Open Academic Journals Index** (Россия), **ULRICH's WEB** (США).

Статьи, поступившие в редакцию, рецензируются. За достоверность сведений, изложенных в статьях, ответственность несут авторы публикаций.

Мнение редакции может не совпадать с мнением авторов материалов.

Адрес редакции: 354000, Россия, г. Сочи,

ул. Конституции, д. 26/2, оф. 6

Сайт журнала: <http://ejournal8.com/>

E-mail: ejm2013@mail.ru

Подписано в печать 16.12.13.

Формат 21 × 29,7/4.

Бумага офсетная.

Печать трафаретная.

Гарнитура Georgia.

Уч.-изд. л. 4,5. Усл. печ. л. 4,2.

Тираж 1000 экз. Заказ № 2.

Учредитель и издатель: ООО «Научный издательский дом "Исследователь"» - Academic Publishing House *Researcher*

CONTENTS

Antonov D.A. Molecular Mechanisms of the Lubricating Function of the Synovial Fluid Control	48
Frolov D.M., Zaitsev V.G. Chitosan-based Matrix, Used to Determine the Bacterial Lipopolysaccharide in Air	58
Mosin O., Ignatov I., Skladnev D., Shvets V. Use of Gram-positive Chemoheterotrophic Bacterium <i>Bacillus subtilis</i> B-3157 with HMP-cycle of Carbon Assimilation for Microbiological Synthesis of [² H]ribose with High Level of Deuterium Enrichment	63
Pavlova V., Vasichkina E., Belopuhov S., Kolotvin A., Lysak V. Effect of Pulse Pressure Treatment on Content of Protein and Some Sugars in Wheat Seeds	79

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 616.72-008.8 : 57.05

**Molecular Mechanisms of the Lubricating Function
of the Synovial Fluid Control**

Dmitry A. Antonov

Open company Rusvisc, Russian Federation
Nagatinskaya st. 3A, bd. 5, Moscow, 117105
PhD (Medicine)
E-mail: drantonov@gmail.com

Abstract. The author in his review presents up-to-date information, concerning the composition and properties of human synovial fluid with an emphasis on detailed description of the molecular mechanisms of the lubricating function control. Three main groups of molecules: (surface-active phospholipids (1), hyaluronic acid (2), and proteins group SZP/lubricine (3), were described in synovial fluid being able to support lubrication; the latter group was considered as the main biopolymers, ensuring the boundary lubrication. On author's opinion, the modern practice of viscosupplementation is not fully functional, since it did not restore the function of the boundary lubrication, lost in the osteoarthritis progression.

Besides the need to correct the composition of current drugs for viscosupplementary therapy, the ensuring of lubricating properties of tissue engineering constructs and media to grow cartilage tissue was in vitro attributed to the practical tasks of joints regenerative biomedicine.

Keywords: synovial fluid; lubricants; surface-active phospholipids; hyaluron acid; lubricine; tribology; viscosupplementation.

Введение. Общебиологическое значение суставов заключается в обеспечении локомоторной функции организма (перемещения всего тела или его частей относительно друг друга) в оптимальном сочетании с другими физиологическими функциями в процессе жизнедеятельности. Это весьма древнее изобретение природы в определенной степени начинает терять свою эффективность у современного человека, прежде всего под влиянием изменившихся условий жизни и ее продолжительности. Только в США более чем у 26 миллионов взрослых зафиксирована дегенеративная патология суставов в виде остеоартроза (ОА), что существенно ограничивает повседневную деятельность людей, и снижает качество жизни. При сплошном исследовании популяций признаки ОА коленного сустава обнаруживаются у 50 % людей обоего пола после 60 лет, у 90 % - после 75 лет, имеются доказательства «омоложения» заболевания [1–3].

Выявлено два ключевых фактора, имеющих значение для развития ОА, - величина нагрузок на сустав и возраст человека. Оба эти фактора в тесной мере взаимосвязаны с уменьшением содержания и нарушением состава биополимеров, составляющих матрикс хряща и органическую часть синовиальной жидкости (СЖ). Доминирует среди этих протеогликанов гиалуроновая кислота (ГК, или гиалуронан по номенклатуре IUPAC) [4, 5].

Основой молекулярных механизмов при ОА, по современным представлениям, является дисбаланс цитокинов, факторов роста, ферментов синтеза и распада матриксных белков и их ингибиторов, что позволяет относить ОА к воспалительным заболеваниям [4, 6]. Современные подходы к лечению ОА основаны на этих молекулярных представлениях о

механизмах его развития, и включают в себя широкий спектр фармакологических и нефармакологических консервативных методик, инвазивных манипуляций и хирургических вмешательств: внутрисуставные и околоуставные инъекции лекарственных препаратов, артроскопический лаваж и дебридмент, корригирующая остеотомия, эндопротезирование. После успехов аутологичной хондропластики, «золотым стандартом» для лечения поздних стадий ОА на сегодня стали технологии, основанные на пересадке аутологичных культивированных хондроцитов или мезенхимальных стволовых клеток [7, 8].

Тем не менее, основная группа пациентов в течение многих лет нуждается в более щадящих методах лечения, не связанных с оперативной коррекцией суставных поверхностей. Именно для них технологией выбора становится интраартикулярная коррекция состава и свойств СЖ, получившая название вискоапплементарной терапии. Поскольку первоначально препараты ГК были единственными, используемыми для этой цели, этот термин у большинства травматологов-ортопедов до настоящего времени ассоциируется с инъекциями ГК [9, 10].

Вязко-эластичные свойства СЖ рассматривались до самого последнего времени, как необходимые и достаточные для возмещения при вискоапплементарной терапии, в то время как ее фрикционные, смазочные свойства оставались на втором месте. Данный обзор призван систематизировать теоретические предпосылки и эмпирический опыт по оценке и улучшению лубрикативных свойств СЖ в технологиях лечения и восстановления функции сустава при остеоартрозе.

1. Биомеханическое обоснование необходимости смешанной смазки при движениях в суставе. При движениях в суставах трение неизбежно и неустранимо, но задачей смазочного аппарата становится минимизация трения. С биофизической точки зрения, поскольку трение определяется как произведение коэффициента трения μ и приложенной силы W ($F = \mu W$), задача сводится к минимизации μ , определяемого свойствами контактирующих поверхностей. Гиалиновый хрящ обладает самым низким коэффициентом трения из известных биоматериалов: в пределах от 0,005 до 0,02. Но при больших величинах сил, которые актуальны при движениях в крупных суставах человека, этого свойства недостаточно. Такие силы могут быть уменьшены с помощью разобщения непосредственного контакта при движениях – смазки, которые в суставах принято делить на две группы – гидродинамические и поверхностные (граничные) лубриканты [11, 12].

Гидродинамическая смазка максимально эффективна при малых и умеренных величинах нагрузок, при этом толщина поверхностной пленки превышает амплитуду неровностей суставной поверхности. Это предотвращает непосредственный контакт при боковом скольжении и обеспечивает рассеивание силы давления всей тощей СЖ, находящейся между противоположными суставными поверхностями. Толщина такой пленки зависит от вязкости СЖ, геометрии и шероховатости суставных поверхностей, а также величины приложенной нагрузки и скорости скольжения. Применяемые нагрузки и давление такой жидкости приводят к упругой деформации суставной поверхности [13]. При низких скоростях скольжения, высоких нагрузках, снижении вязкости СЖ формирования гидродинамической смазки не происходит. В этом случае суставные поверхности оказываются разделенными лишь молекулярной пленкой, или граничной смазкой [14]. Этот слой неизбежно удаляется при каждом повышении нагрузки, и, следовательно, граничные лубриканты должны быстро и непрерывно пополняться [11, 13].

Во время цикла ходьбы суставные поверхности в коленном суставе имеют широкий спектр контактных напряжений и скоростей скольжения. Очевидно, что скорость скольжения становится равной нулю в течение каждого изменения направления движений конечности при шаге. Таким образом, суставные поверхности работают в смешанном режиме смазки, где сосуществуют режимы как гидродинамической, жидко-пленчатой, так и граничной смазки [12, 14].

В составе смешанной смазки, могут присутствовать также экссудативный (*weeping*) и форсированный механизмы лубрикации. Первый порождается высвобождением тканевой жидкости из сжимаемого хряща. Нагрузки передаются через неровности контактирующих поверхностей и сжимают хрящевой матрикс, вызывая экссудацию интерстициальной жидкости. Форсированная смазка происходит в условиях, когда давление возвращает жидкость обратно в хрящевой матрикс, тем самым эффективно увеличивая (или форсируя)

поток смазочных веществ из хряща на суставную поверхность. Подробно эти механизмы приведены в работе [13].

Наличие описанных трибологических свойств имеет решающее значение для снижения износа и обеспечения здорового и функционирующего хряща, и абсолютно необходимо, чтобы предотвращать дегенерацию суставного хряща и развитие ОА.

2. Молекулы, отвечающие за обеспечение лубрикативных свойств СЖ в естественных условиях. Состав СЖ в процессе нормальной жизнедеятельности определяется тремя процессами: трансудацией жидкой части крови, секрецией клеток синовиальной оболочки, диффузией и сдвиганием хрящевого матрикса и мягких тканей сустава. Наличие барьерной функции синовиальной оболочки приводит к тому, что в СЖ отсутствуют белки массой более 160 кД. К важнейшим индикаторам, по которым можно судить об эффективности смазочной функции СЖ, является ее вязкость [5, 13].

При определении основных молекулярных игроков, отвечающих за лубрикативные свойства СЖ, исследователи сосредоточены на трех группах молекул: поверхностно-активных липидах, ГК и белке поверхностной зоны (SZP/lubricin/PRG4). Несмотря на определенные разночтения о роли каждого из этих компонентов [15], накопленные результаты являются основанием для более подробного рассмотрения роли каждой из этих биомолекул.

Фосфатидилхолин, фосфатидилэтаноламин и сфингомиелин) были найдены в составе СЖ, часть их была активно связана с суставной поверхностью. По аналогии с их ролью в уменьшении поверхностного натяжения в составе сурфактанта в легких, эти фосфолипиды были предложены в качестве молекул граничной смазки для суставной поверхности хрящей [16]. Другие исследования, в которых изучались эффекты удаления фосфолипидов с поверхности хряща, не выявили никакого влияния на коэффициент трения, так что текущее мнение состоит в том, что фосфолипиды не способствуют граничной смазке суставного хряща, хотя их состав может существенно изменяться при ОА [14, 17].

Следует признать, что даже если фосфолипиды и могут быть модификаторами и минорными компонентами в обеспечении лубрикативной функции, на роль основных молекул в этом процессе они претендовать не могут.

ГК является основным веществом, определяющим реологические (вязкостные и эластические) свойства СЖ. Она синтезируется фибробластоподобными клетками синовиальной оболочки и частично поступает в СЖ из матрикса хряща. Трехмерная структура ГК близка к спиральной, что позволяет образовывать в растворах сетчатые структуры, обеспечивающие им одновременно эластичность, вязкость, и способность варьировать этими свойствами при смене сдавливающих сил на скользящие [13, 19].

Тем не менее, эксперименты с помощью атомно-силового микроскопа на обработанном гиалуронидазой хряще подтверждают, что ГК служит хондропротектором в основном за счет предотвращения износа поверхности хрящевого матрикса, а не путем уменьшения коэффициента трения [14].

Основной компонент СЖ, обеспечивающий граничную смазку суставных поверхностей - гликопротеин лубрицин (227 кД), синтезируемый клетками синовиальной оболочки. Он относится к семейству белков с муциновым доменом, кодируемых геном *prg4*, куда входят также белок SZP (345 кД, синтезируется хондроцитами поверхностной зоны хряща), собственно протеогликан 4, предшественник мегакариоцит-стимулирующего фактора и гемангиопоэтин. Различия в структуре гомологов появляются в результате посттрансляционной O-гликолизации [19, 20].

Высокая степень гликолизации (O-связанный олигосахарид Gal(β 1-3)-G alNAc-NeuAc в центральном муциновом домене) позволяет лубрицину легко образовывать на поверхности хряща нано пленки с выраженными антиадгезивными и лубрикативными свойствами [21]. Участие лубрицина в обеспечении граничной смазки подтверждено результатами исследований генетических нарушений у человека [21], на животных с экспериментальным артритом [22], нокаутированием гена *prg4* у грызунов [23] и функциональных трибологических экспериментах [24]. В то время как СЖ, обработанная гиалуронидазой, не теряла своих смазочных свойств, обработка протеазой, что позволяло ликвидировать лубрицин, приводило к полной их потере. Также показано, что добавление лубрицина к ГК снижают вязкость и улучшают диффузионные свойства растворов, моделирующих СЖ [22].

Белок SZP синтезируется хондроцитами поверхностной (но не средней и глубокой) зон хряща, а также экспрессирован в жировом теле, менисках, сухожилиях и связках. Считается, что именно он в основном формирует поверхностные нанопленки на суставном хряще, сглаживая неровности и снижая силы "прилипания-скольжения" при контактах суставных поверхностей [25-27]. Поскольку управление синтезом этих двух ключевых белков в суставе ведется содружественно через экспрессию гена *prg4*, в дальнейшем для описания регуляции состава и лубрикативных свойств на молекулярном уровне будет использоваться обозначение SZP/лубрицин.

3. Управление лубрикативной функцией суставной жидкости в норме и при ОА. Экспрессия SZP/лубрицина модулируется многими цитокинами и факторами роста. Так, трансформирующий фактор роста- β и костные морфогенетические белки (BMP) усиливают продукцию этого белка как в хондроцитах поверхностной зоны, так и в синовиоцитах. Эти эффекты синергетичны в обеих популяциях клеток [24, 28]. Регуляция продукции SZP/лубрицина в хондроцитах инсулиноподобным фактором роста-1 (который стимулирует экспрессию аггрекана) в большей мере зависит от ситуации. ИЛ-1 и ФНО- α снижают экспрессию SZP/лубрицина в синовиоцитах и хондроцитах. Хотя ИЛ-1 однократно уменьшал коэффициент трения, в долгосрочной перспективе это повреждение ускоряло изнашивание суставной поверхности [27, 29].

Известно, что экспрессия SZP/лубрицина гетерогенно распределена по суставной поверхности [30]. Топография этой экспрессии может быть частично связана с возникающими в естественных условиях механическими нагрузками. Было установлено, что в коленном суставе быка экспрессия SZP/лубрицина в основном локализована в зоне опорной нагрузки в передних отделах бедренных мышечков, в то время как менее нагруженные задние отделы экспрессировали значительно меньше протеогликана. Повышенные количества SZP/лубрицина в нагружаемых областях коррелировали с низкими величинами коэффициента трения [26].

В других экспериментах экспланты хряща подвергались сжатию в течение 24 часов при статических нагрузках в 6 и 100 кПа, или переменных сжимающих нагрузках в интервалах 3-10 кПа и 3-300 кПа с частотой 0,01 Гц. Во всех опытах происходило значительное снижение экспрессии SZP/лубрицина сразу после воздействия, лишь динамическая нагрузка в 3-300 кПа вызывала полуторакратное увеличение секреции белка в 1-е сутки после нагрузки. Все другие методы воздействия не вызывали достоверных изменений [26]. В монослойной культуре хондроцитов человека при двухосной деформации в 0,5 % и 3,0 % наблюдали почти двукратное увеличение транскрипции *prg4*. Идентичная обработка хондроцитов после более длительного культивирования сопровождалась значительным уменьшением экспрессии, вероятно, ввиду частичной потери хондрального фенотипа [31].

Таким образом, хотя синтез SZP/лубрицина изменяется при сжатии тканей, отсутствие надежного ответа показывает, что механические нагрузки не могут действовать в качестве основного регулятора экспрессии генов.

Современные представления о молекулярном контроле синтеза основных лубрикантов суммированы на рис.

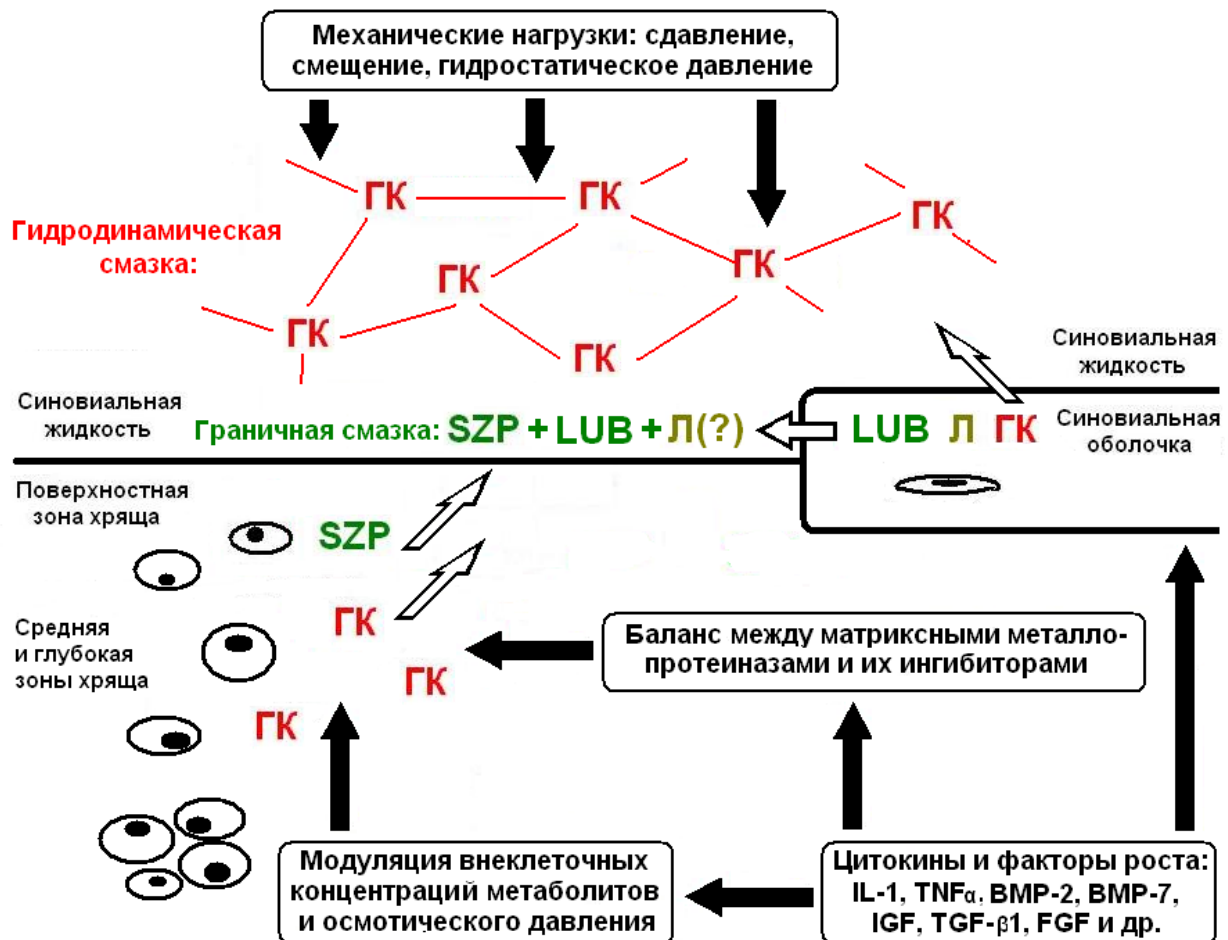


Рис. Основные регуляторные механизмы, обеспечивающие лубрикативные свойства суставных поверхностей. ГК – гиалуроновая кислота, SZP – белок поверхностной зоны хряща, LUB – его гомолог лубрицин, Л - поверхностно-активные фосфолипиды. Темными стрелками показаны управляющие воздействия, светлыми – пути поступления лубрикантов в СЖ

Проблема разрушения хрящевого матрикса и последующая потеря биомеханических функций хряща, являются базисом к пониманию основных событий при ОА. Разрушение хряща при ОА возникает под действием специфических ферментов – матриксных металлопротеиназ (1-3, 8, 9 и 13), которые действуют как на коллаген, так и на протеогликаны матрикса. Основными медиаторами распада хряща при ОА считают ИЛ-1 β и ФНО α . Под действие этих медиаторов при ОА вначале устанавливается определенный баланс на уровне высокой интенсивности как синтеза, так и распада полимеров хрящевого матрикса, затем число клеток в хряще уменьшается, и происходит быстрое снижение синтеза протеогликанов, а распад сохраняется на высоком уровне. Нарушается способность хондроцитов синтезировать полноценные гликозаминогликаны [4]. Параллельно и взаимосвязанно с этим происходит модификация СЖ с уменьшением концентрации ГК и доли в ней молекул с высокой молекулярной массой. Функции такой СЖ, как более вязкой, но менее упругой, меняют весь диапазон движений в суставах, что приводит к дальнейшему снижению защитного действия на клетки и матрикс хряща. Механизмы деградации ГК были описаны. Эти изменения снижают вязкоупругие свойства СЖ и ее способность защищать сустав [32, 33].

Постепенно приходит и понимание того, что при ОА повреждаются также механизмы граничной смазки, обеспечиваемой группой белков SZP/лубрицина. Так, показано, что уровень лубрицина в СЖ уменьшается у пациентов с перенесенными травмами передней крестообразной связки, и это соотносено с краткосрочным подъемом уровня цитокинов после травмы [34, 35]. Также обнаружено, что травмирование изолированных эксплантов хрящевой ткани приводило к повышению трения поверхностей и сопровождалось

повышенным экспрессии SZP/лублицина в хондроцитах, что свидетельствовало о возможной компенсаторной реакции [36]. Моделирование ОА у животных продемонстрировало понижение синтеза лублицина и увеличения коэффициента трения после травм коленного сустава, таких как рассечение передней крестообразной связки и менискэктомия [23, 37].

Взятые вместе описанные факты представляют собой убедительное свидетельство связи развития ОА и нарушения регуляции SZP/лублицина. Подавление синтеза белков граничной смазки приводит к увеличению трения и износа суставной поверхности [25, 36].

4. Подходы к повышению лубрикативных свойств СЖ и хряща. Понимание того, что СЖ коленного сустава больных с ОА содержит гиалуронан со сниженной молекулярной массой и в меньшей концентрации, чем в здоровом суставе, и это влияет на защитные свойства СЖ, стало основой для изучения возможности внутрисуставного введения экзогенного гиалуронана [32]. Уже в течение десятилетия время внутрисуставное введение ГК (вискосапплементарная терапия) официально входит в руководство по лечению ОА коленного сустава, так как обезболивающий эффект сохраняется в течение нескольких месяцев после введения [10, 18, 38]. Имеются положительные результаты использования внутрисуставных инъекций ГК при ОА плечевого, бедренного и голеностопного суставов [39-41].

В настоящее время в мировой практике используются различные составы ГК: от сравнительно низкомолекулярных препаратов (диапазон 500-730 кД) и с промежуточной массой (800-2000 кД), до поперечно-сшитых, с массой 6000 кД и выше. Первая группа – это препараты ГК (гиалуронат натрия) линейного строения, в физиологических растворителях образующие петли случайной формы. Наиболее известны «Hyalgan» (Fidia Farmaceutici, Италия), «Go-on» (Rottapharm, Ирландия), «Suvenyl» (Chugai Pharmaceutical Co, Япония), «Orthovisc» (Anika Therapeutics Inc., США), «Synocrom» (Cromapharma GmbH, Австрия), «Ostenil» и «Viscoseal» (TRB Chemedica, Швейцария), «Fermathron» (Hyaltech Ltd, Великобритания) и Русвиск (Русвиск, Россия). Вторая группа содержит перекрестно-сшитые молекулы ГК. Наиболее известны из них препараты Synvisc (Hylan GF-20, Biomatrix, США), Viscorneal-Ortho (Corneal, Франция) и Durolane (Q-Med AB, Швеция). Период полувыведения ГК зависит от ее средней молекулярной массы, что в итоге определяет длительность курса: препараты первой группы обычно используют до 5 раз, второй группы – до трех раз еженедельно [38, 42].

Однако эффективность вискосапплементарной терапии при ОА по-прежнему обсуждается. Помимо мета-анализов, подтверждающих положительные эффекты ГК (снижение болевого синдрома, улучшение объема движений в суставе, умеренное противовоспалительное действие) [43-45], имеются работы, не подтверждающие преимуществ ГК над плацебо [46, 47].

Преимущество поперечно-сшитых ГК состоит, главным образом, в повышении стабильности и времени пребывания препарата в суставе, тогда как основные клинические эффекты большинства препаратов ГК с различной молекулярной массой практически сопоставимы [48, 49].

Однако чтобы успешно воспроизвести хрящевую смазку, требуется создать условия, максимально отображающую свойства СЖ в нормальном суставном хряще. Новой концепцией в этом подходе является необходимость обеспечить все компоненты смешанной смазки сустава, то есть провести полную трибосупплементацию. Очевидно, что необходимым элементом такого воздействия должно стать обеспечение адекватной граничной смазки, на первом этапе – при сохранении разработанной и апробированной схемы внутрисуставных инъекций.

Flannery et al. [50] с успехом использовали рекомбинантную форму лублицина с укороченным центральным доменом муцина для уменьшения прогрессирования ОА у крыс в модели с менискэктомией. Это исследование не включало ни рентгенографического анализа, ни биохимического анализа СЖ или экспрессии фенотипических маркеров в хондроцитах. Более доказательные результаты, с использованием рентгенологических и гистологических критериев, были получены для очищенного лублицина, полноразмерного рекомбинантного протеогликана 4 человека и модифицированного лублицина у крыс в модели с пересечением передней крестообразной связки [51].

ГК и SZP/лублицины могут использоваться совместно в качестве потенциальной комбинированной терапии для ОА, улучшающей реологические свойства СЖ и лубрикации граничащих поверхностей сустава [23, 37].

В экспериментальных условиях и модельных опытах *in vitro* опробованы и другие трибосуплементы. Chawla et al. [52] показали, что протеогликан 4, функционально соединенный с альдегидной группой, является хорошим спограничным лубрикантом. Другие гликозаминогликаны, такие как хондроитинсульфаты, также изучались в качестве граничной смазки [53]. На основе поверхностно-активных фосфолипидов в виде липосом разработан вариант граничной тонкопленчатой смазки [54].

В то же время понятно, что только повышение граничной смазки, по всей вероятности, будет не в состоянии ослабить симптомы ОА в случае обширной дегградации суставного хряща. Следующим этапом станет обеспечение лубрикативной функции непосредственно в процессе создания биомиметических протезов хрящевой ткани. Эти работы уже начинаются [55, 56].

Поскольку собственный хрящ работает в условиях смешанного режима смазки, принципиально важно подключать компонент граничной смазки в любую тканеинженерную конструкцию для восстановления суставных поверхностей [36]. Проблемы ограниченной доступности клеток здесь будут связаны с тем, что SZP экспрессирован исключительно в хондроцитах поверхностной зоны хряща, что затрудняет их получение для культивирования. Стволовые клетки более доступны, но у них труднее вызвать индукцию синтеза целевого продукта в достаточном количестве [27, 57, 58].

Также не совсем ясно, могут ли трибологические характеристики в должной мере формироваться в процессе ремоделирования тканеинженерной конструкции, или же их следует привносить в нее при изготовлении, сообщая определенные свойства поверхностным слоям на границе с полостью сустава. Предстоит определить, как именно свойства среды или технические характеристик биореактора могут привести к выходу хондроцитов с необходимыми свойствами в отношении устойчивого синтеза лубрикантов. Не исключено, что к процедуре имплантации необходимо будет добавлять временную трибосупплементацию гелями на основе, например, белков группы SZP/лублицина.

Закключение. Проведенный анализ позволяет на современном этапе выделить в понимании регуляции лубрикативной функции синовиальной жидкости суставов две ключевые тенденции. Во-первых, помимо гидродинамических механизмов (и ГК в качестве ее молекулярного носителя), гораздо больше внимания уделяется граничной смазке и, соответственно, группе белков SZP/лублицина, а также механизмам взаимодействия между различными механизмами в суставе в рамках концепции смешанной смазки. Во-вторых, технологии восполнения утраченной лубрикативной функции выходят за пределы вискоапплементарной терапии препаратами ГК, как в направлении внутрисуставных инстилляций других лубрикантов, так и по пути управления их синтезом хондроцитами (в том числе и при аутогенной трансплантации) или придании лубрикативных свойств создаваемым тканеинженерным конструкциям.

Примечания:

1. Sharma L., Kapoor D., Issa S. (2006) Epidemiology of osteoarthritis: an update. *Curr. Opin. Rheumatol.* 18 (2). pp. 147–156.
2. Lawrence R.C., Felson D.T., Helmick C.G., et al. (2008) Estimates of the prevalence of arthritis, other rheumatic conditions in the United States. Part II. *Arthritis Rheum.* 58(1). pp. 26–33.
3. Hunter D.J. (2011) Pharmacologic therapy for osteoarthritis – the era of disease modification. *Nat. Rev. Rheumatol.* 7 (1). pp. 13–22.
4. Brandt K.D., Dieppe P., Radin E.L. (2008) Etiopathogenesis of osteoarthritis. *Rheum. Dis. Clin. North. Am.* 34 (3). pp. 531–559.
5. Hui A.Y., McCarty W.J., Masuda K., et al. (2012) A systems biology approach to synovial joint lubrication in health, injury, and disease. *Wiley Interdiscip. Rev. Syst. Biol. Med.* 4(1). pp. 15–37.
6. Bondeson J., Wainwright Sh., Lauder S., et al. (2006) The role of synovial macrophages and macrophage-produced cytokines in driving aggrecanases, matrix metalloproteinases, and other destructive and inflammatory responses in osteoarthritis. *Arthritis Res Ther.* 8(6). R187.
7. van Osch G.J., Brittberg M., Dennis J.E., et al. (2009) Cartilage repair: past and future – lessons for regenerative medicine. *J. Cell Mol. Med.* 13 (5), pp. 792–810.

8. Malanin D.A., Pisarev V.B., Novochadov V.V. (2010) Restoration of Cartilage Lesions in a Knee Joint: Monograph. *Volgograd: Volgograd Scientific Publishing*, 518 pp. [in Rus.].
9. Aggarwal A., Sempowski I.P. (2003) Hyaluronic acid injections for knee osteoarthritis. Systematic review of the literature. *Int. J. Technol. Assess. Health Care*. 19 (1), pp. 41-56.
10. Goldberg V.M., Buckwalter J.A. (2005) Hyaluronans in the treatment of osteoarthritis of the knee: evidence for disease-modifying activity. *Osteoarthritis Cartil.* 13, pp. 216–224.
11. Greene G.W., Banquy X., Lee D.W., et al. (2011) Adaptive mechanically controlled lubrication mechanism found in articular joints. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 108(13), pp. 5255–5259.
12. McNary S.M., Athanasiou K.A., Reddi A.H. (2012) Engineering lubrication in articular cartilage. *Tissue Eng. Pt B. Rev.* 18(2), pp. 88–100.
13. Neu C.P., Komvopoulos K., Reddi A.H. (2008) The interface of functional biotribology and regenerative medicine in synovial joints. *Tissue Eng. Pt B. Rev.* 14 (3), pp. 235–247.
14. Chan S.M., Neu C.P., Duraine G., et al. (2010) Atomic force microscope investigation of the boundary-lubricant layer in articular cartilage. *Osteoarthritis Cartil.* 18(7), pp. 956-963.
15. Krishnan R., Caligaris M., Mauck R.L., et al. (2004) Removal of the superficial zone of bovine articular cartilage does not increase its frictional coefficient. *Osteoarthritis Cartil.* 12, pp. 947-955.
16. Sarma A.V., Powell G.L., LaBerge M. (2001) Phospholipid composition of articular cartilage boundary lubricant. *J. Orthop. Res.* 19, pp. 671-676.
17. Kosinska M.K., Liebisch G., Lochnit G., et al. (2013) A lipidomic study of phospholipid classes and species in human synovial fluid. *Arthritis Rheum.* 65(9), pp. 2323-2333.
18. Pelletier J.P., Martel-Pelletier J., Raynauld J.-P. (2006) Most recent developments in strategies to reduce the progression of structural changes in osteoarthritis: today and tomorrow. *Arthritis Res. Ther.* 8(2), pp. 1-14.
19. Ikegawa S., Sano M., Koshizuka Y., Nakamura Y. (2000) Isolation, characterization and mapping of the mouse and human PRG4 (proteoglycan 4) genes. *Cytogenet Cell Genet.* 90, pp. 291-297.
20. Liu Y.J., Lu S.H., Xu B., et al. (2004) Hemangiopoietin, a novel human growth factor for the primitive cells of both hematopoietic and endothelial cell lineages. *Blood*. 103, pp. 4449-4456.
21. Rhee D.K., Marcelino J., Baker M., et al. (2005) The secreted glycoprotein lubricin protects cartilage surfaces and inhibits synovial cell overgrowth. *J. Clin. Invest.* 115, pp.622–631.
22. Wei L., Fleming B.C., Sun X., et al. (2010) Comparison of differential biomarkers of osteoarthritis with and without posttraumatic injury in the Hartley guinea pig model. *J. Orthop. Res.* 28, pp. 900-906.
23. Coles J.M., Zhang L., Blum J.J., et al. (2010) Loss of cartilage structure, stiffness, and frictional properties in mice lacking PRG4. *Arthritis Rheum.* 62, pp. 1666-1674.
24. DuRaine G., Neu C.P., Chan S.M., et al. (2009) Regulation of the friction coefficient of articular cartilage by TGF-beta1 and IL-1beta. *J. Orthop. Res.* 27(2), pp. 249-256.
25. Jay G.D., Torres J.R., Rhee D.K., et al. (2007) Association between friction and wear in diarthrodial joints lacking lubricin. *Arthritis Rheum.* 56, pp. 3662–3669.
26. Neu C.P., Khalafi A., Komvopoulos K., et al. (2007) Mechanotransduction of bovine articular cartilage superficial zone protein by transforming growth factor beta signaling. *Arthritis Rheum.* 56, pp. 3706-3714.
27. Lee S.Y., Nakagawa T., Reddi A.H. (2008) Induction of chondrogenesis and expression of SZP/lubricin by mesenchymal progenitors in the infrapatellar fat pad of the knee joint treated with TGF-beta1 and BMP-7. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 376 (1), pp.148-153.
28. Iwakura T., Sakata R., Reddi A.H. (2013) Induction of chondrogenesis and expression of superficial zone protein in synovial explants with TGF-β1 and BMP-7. *Tissue Eng. Part A.* 19(23-24), pp. 2638-2644.
29. Schmidt T.A., Gastelum N.S., Han E.H., et al. (2008) Differential regulation of proteoglycan 4 metabolism in cartilage by IL-1α, IGF-I, and TGF-β1. *Osteoarthritis Cartil.* 16(1), pp. 90-97.
30. Nugent-Derfus G.E. Takara T. et al. (2007) Continuous passive motion applied to whole joints stimulates chondrocyte biosynthesis of PRG4. *Osteoarthritis Cartil.* 15(5), pp. 566-574.
31. Das R.H., Jahr H., Verhaar J.A., et al. (2008) In vitro expansion affects the response of chondrocytes to mechanical stimulation. *Osteoarthritis Cartil.* 16(3), pp. 385-391.
32. Balazs E.A. (2004) Viscosupplementation for treatment of osteoarthritis: from initial discovery to current status and results. *Surg Technol Inter.* 12, pp. 278–289.
33. Rinaudo M. (2007) Properties and degradation of selected polysaccharides. *Corros Eng. Sci. Technol.* 42, pp. 324–334.

34. Elsaid K.A., Fleming B.C., Oksendahl H.L., et al. (2008) Decreased lubricin concentrations and markers of joint inflammation in synovial fluids from patients with anterior cruciate ligament injury. *Arthritis Rheum.* 58, pp. 1707–1715.
35. Teeple E, Elsaid KA, Fleming BC, et al. (2008) Coefficients of friction and cartilage damage in the guinea pig knee. *J. Orthop. Res.* 26, pp. 231–237.
36. Jones A.R., Chen S., Chai D.H., et al. (2009) Modulation of lubricin biosynthesis and tissue surface properties following cartilage mechanical injury. *Arthritis Rheum.* 60 (1), pp. 133–142.
37. Flannery C.R., Zollner R., Corcoran C., et al. (2009) Prevention of cartilage degeneration in a rat model of osteoarthritis by intraarticular treatment with recombinant lubricin. *Arthritis Rheum.* 60 (4), pp. 840–847.
38. Jordan K.M., Arden N.K., Doherty M. et al. (2003) EULAR Recommendations 2003: an evidence based approach to management of knee osteoarthritis: Report of a Task Force of the Standing Committee for International Clinical Studies Including Therapeutic Trials (ESCISIT) *Ann. Rheum. Dis.* 62, pp. 1145–1155.
39. Blaine T., Moskowitz R., Udell J., et al. (2008) Treatment of persistent shoulder pain with sodium hyaluronate: a randomized, controlled trial. A multicenter study. *J. Bone Joint Surg. Am.* 90 (5), pp. 970–979.
40. Witteveen A.G., Giannini S., Guido G., et al. (2008) A prospective multi-centre, open study of the safety and efficacy of hylan G-F 20 (Synvisc) in patients with symptomatic ankle (talo-crural) osteoarthritis. *Foot Ankle Surg.* 14 (3), pp. 145–152.
41. Richette P., Ravaud P., Conrozier T., et al. (2009) Effect of hyaluronic acid in symptomatic hip osteoarthritis: a multicenter, randomized, placebo-controlled trial. *Arthritis Rheum.* 60 (3), pp. 824–830.
42. Trigkilidas D., Anand A. (2013) The effectiveness of hyaluronic acid intra-articular injections in managing osteoarthritic knee pain. *Ann. R. Coll. Surg. Engl.* 95(8), pp. 545–551.
43. Modawal A., Ferrer M., Choi H.K., et al. (2005) Hyaluronic acid injections relieve knee pain. *J. Fam. Pract.* 54 (9), pp. 758–767.
44. Bellamy N., Campbell J., Robinson V., et al. (2006) Intraarticular corticosteroid for treatment of osteoarthritis of the knee. *Cochrane Database Syst. Rev.* (2), CD005321.
45. Bagga H., Burkhardt D., Sambrook P., March L. (2006) Long term effects of intraarticular hyaluronan on synovial fluid in osteoarthritis of the knee. *J. Rheumatol.* 33 (5), pp. 946–950.
46. Arrich J., Piribauer F., Mad P., et al. (2005) Intra-articular hyaluronic acid for the treatment of osteoarthritis of the knee: systematic review and meta-analysis. *Can. Med. Assoc. J.* 172 (8), pp. 1039–1043.
47. Medina J.M., Thomas A., Denegar C.R. (2006) Knee osteoarthritis: should your patient opt for hyaluronic acid injection? *J. Fam. Pract.* 55 (6), pp. 669–675.
48. Kirchner M., Marshall D. (2006) A double-blind randomized controlled trial comparing alternate forms of the high molecular weight hyaluronan for the treatment of osteoarthritis of the knee. *Osteoarthritis Cartil.* 14 (2), pp. 154–162.
49. Reichenbach S., Blank S., Rutjes A.W., et al. (2007) Hylan versus hyaluronic acid for osteoarthritis of the knee: a systematic review and meta-analysis. *Arthritis Rheum.* 57 (8), pp. 1410–1418.
50. Flannery C.R., Zollner R., Corcoran C., et al. (2009) Prevention of cartilage degeneration in a rat model of osteoarthritis by intraarticular treatment with recombinant lubricin. *Arthritis Rheum.* 60 (3), pp. 840–847.
51. Fleming B.C., Watkins B.A., McHugh K.A., et al. (2010) Prevention of cartilage degeneration and restoration of chondroprotection by lubricin tribosupplementation in the rat following anterior cruciate ligament transection. *Arthritis Rheum.* 62 (8), pp. 2382–2391.
52. Chawla K., Ham H.O., Nguyen T., Messersmith P.B. (2010) Molecular resurfacing of cartilage with proteoglycan 4. *Acta Biomater.* 6 (9), pp. 3388–3394.
53. Katta J., Jin Z., Ingham E., Fisher J. (2009) Chondroitin sulphate: an effective joint lubricant? *Osteoarthritis Cartil.* 17 (8), pp. 1001–1008.
54. Wang M., Liu C., Thormann E., Dedinaite A. (2013) Hyaluronan and phospholipid association in biolubrication. *Biomacromolecules.* 14(12), pp. 4198–4206.
55. Moutos F.T., Guilak F. (2010) Functional properties of cell-seeded three-dimensionally woven poly(epsilon-caprolactone) scaffolds for cartilage tissue engineering. *Tissue Eng Part A.* 16:1291–1301.
56. Smith A.M., Fleming L., Wudebwe U., et al. (2013) Development of a synovial fluid analogue with bio-relevant rheology for wear testing of orthopaedic implants. *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* 18 (32C), pp. 177–184.

57. Malanin D.A., Novochadov V.V., Samusev S.R., et al. (2009) Innovative technologies in restoration of damaged or diseased knee joint. *Herold Volgograd State Med. Univ. [Vestnik Volgogradskogo Gosudarstvennogo Meditsinskogo Universiteta]*. (2), pp. 7-13. [in Rus.]

58. Lee S.Y., Nakagawa T., Reddi A.H. (2010) Mesenchymal progenitor cells derived from synovium and infrapatellar fat pad as a source for superficial zone cartilage tissue engineering: analysis of superficial zone protein/lubricin expression. *Tissue Eng Part A*. 16(1), pp. 317-325.

УДК 616.72-008.8 : 57.05

Молекулярные механизмы управления смазочной функцией синовиальной жидкости

Dmitry A. Antonov

ООО «Русвиск», Москва, Россия
Ул. Нагатинская, 3А, стр. 5, Москва, 117105
Генеральный директор, кандидат медицинских наук
E-mail: drantonov@gmail.com

Аннотация. В обзоре приведены современные сведения о составе и свойствах синовиальной жидкости человека с акцентом на детальное описание молекулярных механизмов поддержания лубрикативной функции. Из спектра молекул с доказанными лубрикативными свойствами в СЖ (поверхностно-активные фосфолипиды, гиалуроновая кислота, белки группы SZP/лубрицина), последние были рассмотрены в качестве основных биополимеров, обеспечивающих свойства граничной смазки. Указано на относительную физиологическую неполноценность современной практики вискоссаплементации, поскольку ее использование не восстанавливает функцию граничной смазки, утраченную при прогрессировании остеоартроза. Помимо необходимости координировать состав современных препаратов для вискоссаплементарной терапии, обеспечение лубрикативных свойств тканеинженерных конструкций и сред для выращивания хрящевой ткани *in vitro* отнесено к насущным задачам в области регенераторной биомедицины суставов.

Ключевые слова: синовиальная жидкость; лубриканты; поверхностно-активные фосфолипиды; гиалуроновая кислота; лубрицин; трибология; вискоссаплементарная терапия.

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 воджно-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.

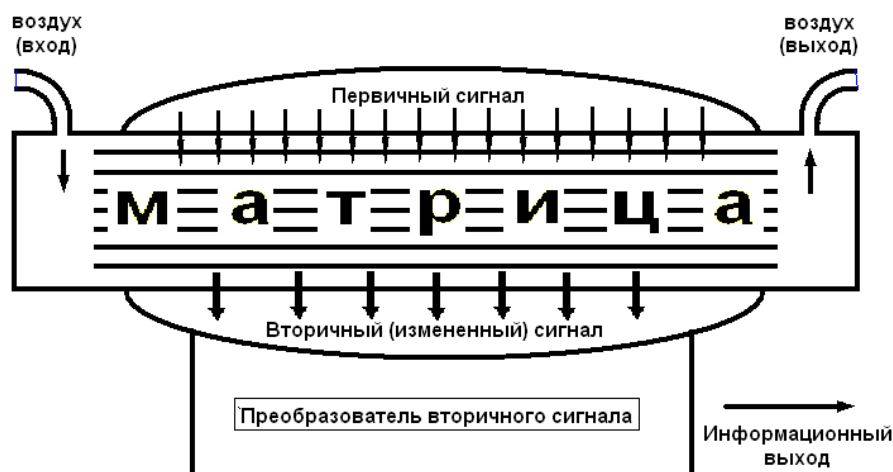


Рисунок. Рабочая схема устройства для определения бактериального ЛПС в воздушной среде

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. Haldal 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.

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 579.871.08

Use of Gram-positive Chemoheterotrophic Bacterium *Bacillus subtilis* B-3157 with HMP-cycle of Carbon Assimilation for Microbiological Synthesis of [²H]riboxine with High Level of Deuterium Enrichment

¹Oleg Mosin²Ignat Ignatov³Dmitry Skladnev⁴Vitaly Shvets

¹ Moscow State University of Applied Biotechnology, Russian Federation
Senior research Fellow of Biotechnology Department, Ph. D. (Chemistry)
103316, Moscow, ulitza Talalihinina, 33

E-mail: mosin-oleg@yandex.ru

² The Scientific Research Center of Medical Biophysics (SRC MB), Bulgaria
Professor, D. Sc., director of SRC MB.

1111, Sofia, N. Kopernik street, 32

E-mail: mbioph@dir.bg

³ Scientific Center of Russian Federation Research Institute for Genetics and Selection of Industrial Microorganisms "Genetika", Russian Federation

Professor, D. Sc (Biology), leading scientist of Genetika

117545, Moscow, 1st Dorozhniy proezd, 1

E-mail: genetika@genetika.ru

⁴ M. V. Lomonosov Moscow University of Fine Chemical Technology, Russian Federation
Academician of Russian Academy of Sciences, D. Sc. (Chemistry), head of department of biotechnology and nanobiotechnology.

119571, Moscow, Vernadskogo avenue, 86

E-mail: mitht@mitht.ru

Abstract. We studied the growth and biosynthetic properties of a strain of Gram-positive chemoheterotrophic bacterium *Bacillus subtilis* B-3157– producer of ²H-labeled purine ribonucleoside riboxine (outcome is 3,9 g/l) in heavy hydrogen (HH) medium with high level of deuterium enrichment (99,8 at.% ²H₂O) with 2 % hydrolysate of deuterated biomass of methylotrophic bacterium *Brevibacterium methylicum* B-5662 as a source of ²H-labeled growth substrates, obtained in the minimal M9 growth medium of 98 % ²H₂O and 2 % [²H]methanol. Isolation of riboxine from liquid culture of riboxine producer strain was carried out by adsorption/resorption on a surface of activated carbon coal, extraction by 0.3 M NH₄-formiate buffer (pH = 8.9) with the subsequent crystallization in 80 % of ethanol and column ion exchange chromatography on cation exchanger AG50WX 4, counterbalanced with 0.3 M NH₄-formiate with 0.045 M NH₄Cl (outcome of riboxine is 3.1 g/l (80 %)). The level of deuterium enrichment of biosynthetically prepared riboxine, analyzed by a method of fast atom bombardment (FAB) mass-spectrometry makes up 5 deuterium atoms with incorporation of 3 deuterium atoms into ribose and 2 deuterium atoms into hypoxantine fragments of the molecule.

Keywords: *Bacillus subtilis*; [²H]riboxine; biosynthesis; heavy water; fast atom bombardment mass spectrometry (FAB).

Введение. Природные нуклеозиды, меченные дейтерием (^2H), представляют значительный научно-практический интерес для многочисленных медицинских и диагностических целей [1], структурно-функциональных исследований [2], а также для изучения клеточного метаболизма [3]. В частности, дейтерированные рибонуклеозиды и их аналоги применяются в матричных синтезах молекул дейтерированных РНК для изучения их пространственной структуры и конформационных изменений [4].

Важным фактором в исследованиях с дейтерированными нуклеозидами и их аналогами является их доступность. ^2H -меченые нуклеозиды могут быть синтезированы с использованием химических, ферментативных и микробиологических методов [5, 6]. Химические синтезы часто многостадийны, требуют больших расходов дорогостоящих реагентов и ^2H -меченых субстратов и приводят к конечному продукту, представляющему собой рацемическую смесь *D*- и *L*-энантиомеров, для разделения которых требуются специальные методы [7]. Более тонкие химические технологии синтеза [^2H]нуклеозидов связаны с комбинацией химических и ферментативных подходов [8].

Для многих научно-прикладных целей биотехнология предлагает альтернативный микробиологический метод синтеза [^2H]нуклеозидов, который характеризуется высокими выходами синтезируемых продуктов, эффективным включением дейтерия в молекулы и сохранению природной *L*-конфигурации синтезируемых соединений [9]. Традиционным подходом при этом является выращивание штаммов-продуцентов в средах с максимальными концентрациями $^2\text{H}_2\text{O}$ и дейтерированных субстратов. Однако основным препятствием практической реализации этого метода является недостаток ^2H -меченых ростовых субстратов высокого уровня дейтерированности. Прежде всего это связано с ограниченной доступностью и дороговизной высокоочищенного дейтерия, выделяемого из природных источников. Природная распространенность дейтерия составляет 0,015 ат.%, однако, несмотря на невысокое содержание дейтерия в пробах, разработанные в последние годы методы обогащения и очистки дейтерия позволяют получать ^2H -меченые субстраты высокого уровня изотопной чистоты

Начиная с первых экспериментов по выращиванию природных объектов в тяжелой воде, в нашей стране разрабатываются подходы с использованием гидролизатов дейтерированной биомассы бактерий и микроводорослей как ростовых субстратов для биосинтеза штаммов-продуцентов [10]. Эксперименты обнаружили бактериостатический эффект дейтерия, заключающийся в ингибировании жизненно-важных функций клетки, оказываемой 50 % $^2\text{H}_2\text{O}$ на растительные клетки и 80–90 % $^2\text{H}_2\text{O}$ на клетки простейших и бактерий [11]. Попытки использовать для синтеза в $^2\text{H}_2\text{O}$ природных объектов различной таксономической принадлежности, включая бактерии, микроводоросли и дрожжи [12] не получили широкого распространения в биотехнологии из-за трудности биосинтеза, использования комплексных ростовых сред, сложности технологической схемы и т. п. Поэтому целый ряд практических вопросов биосинтеза природных дейтерированных соединений в $^2\text{H}_2\text{O}$ остается неизученным.

Более перспективны технологические схемы синтеза с использованием в качестве дейтерированных ростовых субстратов биомассы метилотрофных бактерий, ассимилирующих метанол по рибулозо-5-монофосфатному (РМФ) и сериновому пути фиксации углерода, интерес к которым возрастает благодаря интенсивному развитию технологии химического синтеза метанола [13]. Усваиваемость метилотрофной биомассы клетками простейших организмов и эукариот составляет 85–98 %, а их производительность, измеренная по уровню биоконверсии метанола в клеточные компоненты, достигает 50–60 % [14]. Как было показано нами ранее, метилотрофные бактерии — неприхотливые объекты, растут на минимальных средах с 2–4 % [^2H]метанолом, в которых другие бактерии не размножаются, и достаточно легко адаптируются к максимальным концентрациям $^2\text{H}_2\text{O}$, что существенно для биосинтеза дейтерированных природных соединений [15].

Большой научно-практический интерес к использованию дейтерированной биомассы метилотрофных бактерий для биосинтеза рибонуклеозидов определил направление исследования. Целью работы являлось изучение принципиальной возможности биосинтеза [^2H]рибоксина штаммом грамположительных хемогетеротрофных бактерий *Bacillus subtilis* B-3157 за счет использования в качестве источника дейтерированных субстратов 99,8 % $^2\text{H}_2\text{O}$ и 2

% гидролизат дейтеро-биомассы факультативных метилотрофных бактерий *Brevibacterium methylicum* B-5662, полученной со среды с максимальным содержанием дейтерия.

Материалы и методы. Объектом исследования являлся полиауксотрофный по гистидину, тирозину, аденину и урацилу (потребность 10 мг/л) штамм спорообразующих аэробных грамположительных хемогетеротрофных бактерий *Bacillus subtilis* ВКПМ В-3157 – продуцент рибоксина, полученный из коллекции культур ГОСНИИ Генетики и селекции промышленных штаммов микроорганизмов. Исходный штамм был предварительно адаптирован к дейтерию расеевом до отдельных колоний на 2 %-ном агаре со ступенчато увеличивающимся градиентом концентрации $^2\text{H}_2\text{O}$ и последующей селекции по признаку устойчивости к $^2\text{H}_2\text{O}$.

Для приготовления ростовых сред использовали $^2\text{H}_2\text{O}$ (99,8 ат.% ^2H), ^2HCl (95,5 ат.% ^2H) и [^2H]метанол (97,5 ат.% ^2H) (ЗАО “Изотоп”, Санкт-Петербург, Россия). Неорганические соли и D, L-глюкозу (“Reanal”, Венгрия) предварительно перекристаллизовывали в $^2\text{H}_2\text{O}$, $^2\text{H}_2\text{O}$ дистиллировали над KMnO_4 с последующим контролем изотопной чистоты ^1H ЯМР-спектроскопией на приборе Bruker WM-250 (“Bruker Daltonics”, ФРГ) (рабочая частота 70 МГц, внутренний стандарт Me_4Si). Согласно данным ^1H ЯМР, уровень дейтерированности ростовой среды был ниже на 8–10 ат.% изотопной чистоты исходной $^2\text{H}_2\text{O}$.

Выращивание штамма-продуцента рибоксина проводили тяжеловодородной (ТВ) среде (89–90 ат.% ^2H), используя в качестве источника ^2H -меченых ростовых субстратов 2 %-ный гидролизат дейтерированной биомассы ассимилирующего метанол штамма факультативных грамположительных метилотрофных бактерий *Brevibacterium methylicum* ВКПМ В-5662, полученного селекцией в условиях многоступенчатой адаптации на твердой (2 % агар) минимальной среде М9 ((г/л): KH_2PO_4 – 3; Na_2HPO_4 – 6; NaCl – 0,5; NH_4Cl – 1) с 2 % [^2H]метанолом и ступенчато увеличивающимся градиентом концентрации тяжелой воды (от 0; 24,5; 73,5 до 98 об.% $^2\text{H}_2\text{O}$). Сырую метилотрофную биомассу (выход 200 г/л среды) суспендировали в 100 мл 0,5 н. ^2HCl (в $^2\text{H}_2\text{O}$), автоклавировали 30–40 мин при 0,8 атм. Полученную суспензию нейтрализовали 0,2 М KOH (в $^2\text{H}_2\text{O}$), до $\text{pH} = 7,0$, после чего использовали в качестве источника ростовых субстратов при выращивании штамма-продуцента рибоксина. Для этого посевной материал в количестве 5 – 6 масс.% переносили в ТВ-среду с $^2\text{H}_2\text{O}$ (масс.%): глюкоза – 12; гидролизат дейтеро-биомассы *B. methylicum* – 2; NH_4NO_3 – 2; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 1; CaCO_3 – 2; аденин – 0,01; урацил – 0,01. В качестве контроля использовали протонированную среду с 2 % белково-витаминным концентратом (БВК) дрожжей. Выращивание бактерий проводили в колбах Эрленмейера вместимостью 500 мл (наполнение средой 100 мл) в течение 3–4 сут при 32 °С в условиях интенсивной аэрации на орбитальной качалке S-380 (“Biorad Labs”, Венгрия). Бактериальный рост контролировали по способности к образованию отдельных колоний на поверхности твердых агаризованных (2 % агар) сред, а также по величине ОП суспензии клеток, измеренной на спектрофотометре Beckman DU-6 (“Beckman Coulter”, США) при $\lambda = 540$ нм в кварцевой кювете с длиной оптического пути 10 мм. Уровень биоконверсии углеродного субстрата определяли, используя глюкозооксидазу (КФ 1.1.3.4).

Аналитическое определение рибоксина проводили в пробах КЖ, объемом 10 мкл на хроматографических пластинках (150×150 мм) с закрепленным слоем флуоресцирующего носителя Silufol UV-254 (“Kavalier”, Чехия) с использованием стандартного набора рибонуклеозидов фирмы “Beckman-Spinco” (США) в системе растворителей: *n*-бутанол – уксусная кислота – вода (2 : 1 : 1, об.%). Элюирование пятен проводили 0,1 н. HCl . УФ-поглощение элюатов определяли на спектрофотометре Beckman DU-6 (“Beckman Coulter”, США), используя стандартную калибровочную кривую.

Для выделения [^2H]рибоксина пробы КЖ разделяли на центрифуге Т-26 (“Carl Zeiss”, ФРГ) при 2000 *g*, 10 мин, концентрировали при 10 мм рт. ст. в роторном испарителе РВО-6 (“Microtechna”, Венгрия) до объема, в два раза меньше исходного, добавляли ацетон при 0 °С (3×5 мл). Смесь выдерживали ~10 ч при 4 °С, осадок отделяли центрифугированием при 1200 *g*, 5 мин. К супернатанту добавляли 10 г активированного угля, выдерживали 24 ч при 4 °С. Водную фракцию отделяли фильтрованием, к твердой фазе добавляли 20 мл 50 % этанола в 25 % аммиаке (1 : 1, об.%), нагревали при 60 °С с обратным водяным холодильником. Через 2–

з ч смесь фильтровали и упаривали при 10 мм рт. ст. Продукт экстрагировали 0,3 М NH_4 -формиатным буфером (рН = 8,9), промывали ацетоном (2×10 мл), сушили над безводным CaCl_2 . Рибоксин перекристаллизовывали из 80 % этанола ($[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +1,61^\circ$, выход 3,1 г/л, 80 %). Конечная очистка рибоксина производилась методом ИОХ на откалиброванной колонке с ручным отбором проб размерами 150 × 10 мм с катионообменной смолой AG50WX 4 (“Pharmacia”, США). Колонку уравнивали 0,3 М NH_4 -формиатным буфером (рН = 8,9) с 0,045 М NH_4Cl и элюировали тем же буфером в условиях изократической элюции (хроматографическая чистота 92 %). Элюат подвергали лиофильной сушке и хранили в запаянных ампулах при -4°C . Выход рибоксина 3,1 г/л (80 %); $T_{\text{пл.}} = 68 - 70^\circ\text{C}$; $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +1,61^\circ$ (этанол); $R_f = 0,5$; $pK_a = 1,2$ (фосфатный буфер, рН = 6,87). УФ-спектр (0,1 н. HCl): ($\lambda_{\text{макс}} = 249$ нм, $\varepsilon_{249} = 7100 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$); масс-спектр ББА (глицериновая матрица Cs^+ , ускоряющее напряжение 5 кВ, ионный ток 0,6–0,8 мА): ($[\text{M} + \text{H}]^+ m/z (I, \%)$): 273, 20 % (4 ат. ^2H); 274, 38 % (5 ат. ^2H); 275, 28 % (6 ат. ^2H); 276, 14 % (7 ат. ^2H), $[\text{A} + \text{H}]^+ 136, 46 \%$; $[\text{B} + \text{H}]^+ 138, 55 \%$; $[\text{B} - \text{HCN}]^+ 111, 49 \%$; $[\text{B} - \text{HCN}]^+ 84, 43 \%$.

УФ-спектры регистрировали на программируемом спектрофотометре Beckman DU-6 (“Beckman Coulter”, США) в диапазоне длин волн $\lambda = 220 - 280$ нм.

Аминокислотный анализ гидролизатов биомассы проводили на катионообменной колонке Biotronic LC-5001 (“Eppendorf-Nethleler-Hinz”, ФРГ) (230×3,2 мм); неподвижная фаза — сульфированная стирольная (7,25 % сшивки) смола UR-30 (“Beckman-Spinco”, США); диаметр гранул — 25 мкм; элюент — 0,2 н. Na^+ -цитратный буфер (рН = 2,5); рабочее давление — 50–60 атм; скорость подачи элюента — 18,5 мл/ч; нингидрина — 9,25 мл/ч; детекция при $\lambda = 570$ нм и $\lambda = 440$ нм (для пролина).

Анализ углеводов осуществляли на жидкостном хроматографе Knauer Smartline (“Knauer”, ФРГ), снабженным насосом Gilson (“Gilson Inc.”, ФРГ) и рефрактометром Waters K 401 (“Water Associates”, ФРГ); неподвижная фаза: Ultrasorb CN; габаритные размеры колонки — 250×10 мм; диаметр гранул — 10 мкм; подвижная фаза — ацетонитрил – вода (75 : 25, об.%); скорость подачи — 0,6 мл/мин.

Масс-спектры ББА получены на импульсном масс-спектрометре VG-70 SEQ (“Fisons VG Analytical”, США), снабженным цезиевым источником Cs^+ на глицериновой матрице с ускоряющим напряжением 5 кВ и ионным током 0,6–0,8 мА.

Масс-спектры электронного удара (ЭУ) получены на приборе MB-80A (“Hitachi”, Япония) с двойным фокусированием (энергия ионизирующих электронов — 70 эВ, ускоряющее напряжение — 8 кВ, температура катодного источника — 180–200 °С) после модификации аминокислот в метиловые эфиры 5-(диметиламино)нафтален-1-сульфонил хлоридных (дансильных) производных аминокислот по разработанной ранее методике [16].

Результаты и обсуждение. В качестве продуцента рибоксина использовали мутантный полиауксотрофный по гистидину, тирозину, аденину и урацилу штамм грамположительных хемогетеротрофных бактерий *Vacillus subtilis B-3157* (предварительно адаптированный к дейтерию селекцией до отдельных колоний), который из-за нарушения метаболических путей регуляции биосинтеза пуриновых рибонуклеозидов синтезирует в стандартных условиях выращивания (БВК-среда, поздний экспоненциальный рост, 32 °С) 17–20 г рибоксина на 1 л культуральной жидкости (КЖ) [17]. Максимальный выход рибоксина данным штаммом достигался при использовании протонированной среды, содержащей в качестве источника углерода и энергии глюкозу (не менее 12 масс.%), а в качестве источника ростовых факторов и аминного азота — 2 % БВК дрожжей.

При проведении биосинтеза требовалось заменить протонированные ростовые субстраты их дейтерированными аналогами, а также использовать $^2\text{H}_2\text{O}$ высокого уровня изотопной чистоты. Для решения поставленной задачи использовали автолизированную биомассу адаптированного к дейтерию грамположительного штамма факультативных метилотрофных бактерий *Brevibacterium methylicum B-5662*, ассимилирующего метанол по рибулозо-5-монофосфатному циклу фиксации углерода, который благодаря 50–60 % уровню биоконверсии метанола (при эффективности конверсии 15,5–17,3 г. сух. биомассы на 1 г потребленного субстрата) и устойчивому росту в минимальной дейтерированной среде M9 с

$^2\text{H}_2\text{O}$ и $[\text{H}^2]$ метанолом оказался очень удобным источником для наработки дейтеро-биомассы, а затраты на биоконверсию определяются, в основном, стоимостью $^2\text{H}_2\text{O}$ и $[\text{H}^2]$ метанола [18].

Проведение адаптации для *B. methylicum* определялось необходимостью улучшения ростовых характеристик штамма и достижения высокого выхода микробной биомассы в максимально дейтерированной среде М9. Для этого использовали рассев клеток на твердые среды М9 (2 % агар) со ступенчато увеличивающимся градиентом концентрации $^2\text{H}_2\text{O}$ (от 24,5; 49,0; 73,5 до 98 % $^2\text{H}_2\text{O}^*$) в присутствии 2 % метанола и его дейтерированного аналога и последующей селекции (табл. 1). Условия адаптации показаны в опыте 10' (табл. 1). Техника адаптации была разработана на предыдущем этапе работы и подробно описана в работе [19]. Выход микробной биомассы у адаптированного штамма *B. methylicum* уменьшался на 13 % по сравнению с исходным штаммом (опыт 1) при увеличении времени генерации до 2,8 ч, а продолжительности лаг-периода до 40 ч (табл. 1). После переноса в протонированную среду адаптированный штамм возвращался к нормальному росту после некоторого лаг-периода.

Таблица 1

Условия адаптации, изотопный состав ростовых сред и характеристики роста *B. methylicum**

Номер опыта	Компоненты среды, об.%				Лаг-период, ч	Выход микробной биомассы, г/л	Время генерации, ч
	H_2O	$^2\text{H}_2\text{O}$	метанол	$[\text{H}^2]$ метанол			
1	98,0	0	2	0	20±1,40	200,2±3,20	2,2±0,20
2	98,0	0	0	2	30±1,44	184,6±2,78	2,4±0,23
3	73,5	24,5	2	0	32±0,91	181,2±2,89	2,4±0,25
4	73,5	24,5	0	2	34±0,89	171,8±1,81	2,6±0,23
5	49,0	49,0	2	0	40±0,90	140,2±1,96	3,0±0,32
6	49,0	49,0	0	2	44±1,38	121,1±1,83	3,2±0,36
7	24,5	73,5	2	0	45±1,41	112,8±1,19	3,5±0,27
8	24,5	73,5	0	2	49±1,91	94,4±2,74	3,8±0,25
9	0	98,0	2	0	58±1,94	65,8±1,13	4,4±0,70
10	0	98,0	0	2	60±2,01	60,2±1,44	4,9±0,72
10'	0	98,0	0	2	40±0,88	174,0±4,83	2,8±0,30

* Данные опытов 1–10 приведены для *B. methylicum* при выращивании на водных средах М9, содержащих 2 % метанол/ $[\text{H}^2]$ метанол и указанное количество (%) $^2\text{H}_2\text{O}$. Данные опыта 10' приведены для адаптированной к максимальному содержанию дейтерия в среде бактерии *B. methylicum* при выращивании на среде М9, содержащей 2 % $[\text{H}^2]$ метанол и 98 % $^2\text{H}_2\text{O}$. В качестве контроля использовали опыт 1, где применяли обычную воду и метанол.

За ходом адаптации наблюдали, измеряя динамики роста исходного (рис. 1, кривая 2) и адаптированного к дейтерию (рис. 1, кривая 3) штамма *B. methylicum* в максимально дейтерированной среде М9, содержащей 98 % $^2\text{H}_2\text{O}$ и 2 % $[\text{H}^2]$ метанол (рис. 1, кривая 1 (контроль)) получен в протонированной среде М9), а также по изменению продолжительности лаг-периода, времени генерации и выходов микробной биомассы. В отличие от адаптированного штамма (рис. 1, кривая 3), ростовые динамики исходного штамма (рис. 1, кривая 2) в максимальной дейтерированной среде ингибировались дейтерием. В результате удалось получить 87 г/л дейтеро-биомассы *B. methylicum*, которая в дальнейшем использовалась в качестве источника дейтерированных субстратов при выращивании штамма *B. subtilis* – продуцента рибоксина.

* Здесь и далее использованы проценты по объему

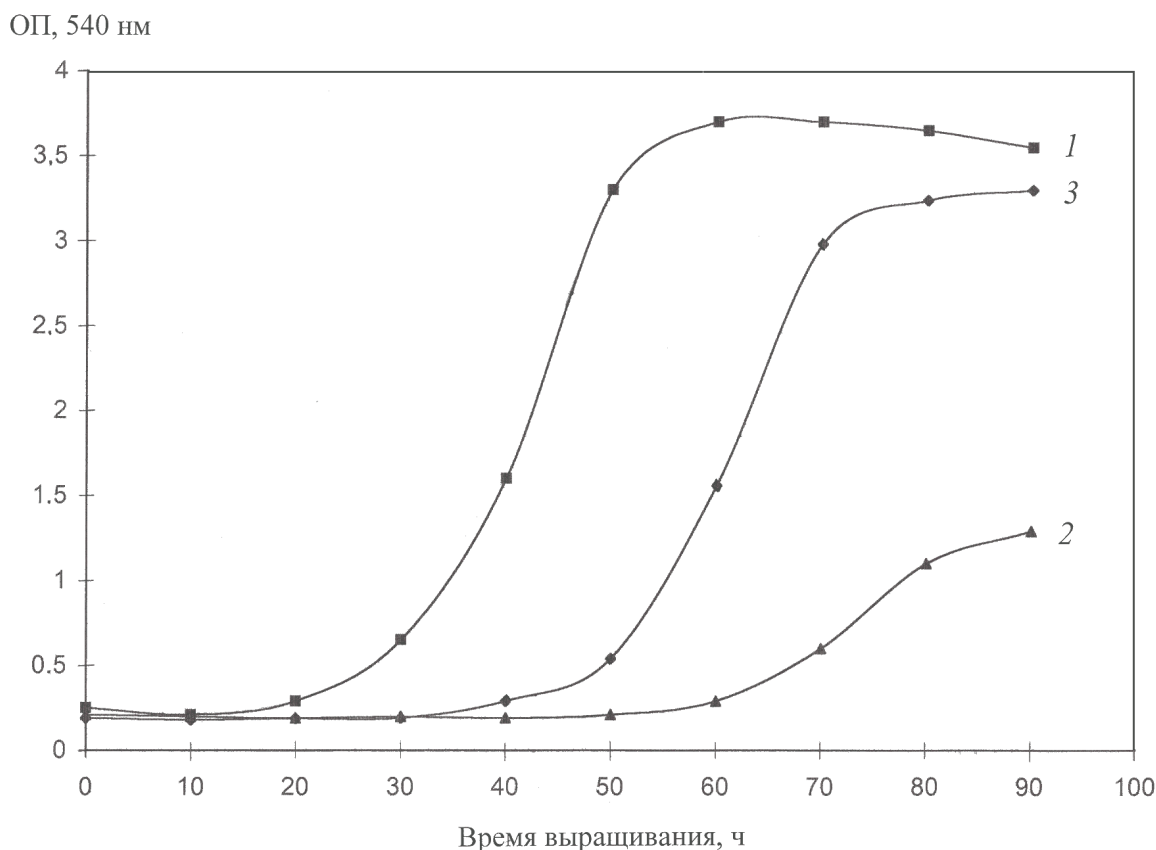


Рис. 1. Динамики роста *V. methylicum* в различных экспериментальных условиях: 1 — исходный метилотроф в протонированной среде М9 с водой и метанолом; 2 — исходный метилотроф в максимально дейтерированной среде М9; 3 — адаптированный к дейтерию метилотроф в максимально дейтерированной среде М9.

Стратегия биосинтеза ^2H -меченого рибоксина за счет использования в качестве ростовых субстратов метилотрофной биомассы *V. methylicum* разрабатывалась с учетом способности метилотрофных бактерий синтезировать большое количество белка (выход 50 % от массы сухого вещества), 15–17 % полисахаридов, 10–12 % липидов (в основном, фосфолипиды) и 18 % зольных веществ [20]. Для обеспечения высоких выходов этих соединений и минимизации реакций обратного (^1H – ^2H) обмена в аминокислотных остатках молекул белков гидролиз биомассы проводили автоклавированием в 0,5 н. ^2HCl (в $^2\text{H}_2\text{O}$). Поскольку штамм *V. subtilis* — продуцент рибоксина является полиауксотрофным штаммом, нуждающимся для роста в тирозине и гистидине, исследовали качественный и количественный состав ароматических аминокислот гидролизата метилотрофной биомассы, полученного в максимально дейтерированной среде с 98 % $^2\text{H}_2\text{O}$ и 2 % [^2H]метанолом, а также уровни их дейтерированности (табл. 2). Качественный и количественный состав аминокислот метилотрофного гидролизата изучали на катионообменной колонке Biotronic LC-5001 (“Eppendorf-Nethleler-Hinz”, ФРГ) с сульфированной смолой UR-30, а уровни дейтерированности молекул — масс-спектрометрией ЭУ метиловых эфиров N-(диметиламино)нафтален-1-сульфонил хлоридных производных аминокислот, полученных обработкой смеси белкового гидролизата дансилхлоридом и диазометаном. Метилотрофный гидролизат представлен пятнадцатью идентифицированными аминокислотами (за исключением пролина, который детектировался при $\lambda = 440$ нм) при содержании тирозина и гистидина в 1 г сухого метилотрофного гидролизата 1,82 % и 3,72 %, что удовлетворяет ауксотрофности штамма-продуцента в этих аминокислотах. Содержания других аминокислот в гидролизате также сопоставимы с потребностями штамма в источниках углерода и аминного азота (табл. 2). Индикатором, определяющим высокую эффективность включения дейтерия в синтезируемый продукт, служат высокие уровни дейтерированности молекул

аминокислот, которые варьируют от 49 % для лейцина(изолейцина) до 97,5 % для аланина (табл. 2). Это позволило использовать гидролизат дейтеро-биомассы метилотрофных бактерий *B. methylicum* как источник ростовых субстратов для выращивания штамма *B. subtilis* – продуцента рибоксина.

Таблица 2

Аминокислотный состав гидролизата биомассы факультативной метилотрофной бактерии *B. methylicum*, полученный с максимально дейтерированной среды М9 с 98 % $^2\text{H}_2\text{O}$ и 2 % $[\text{H}^2]$ метанолом и уровни дейтерированности молекул

Аминокислота	Выход, % от сухого веса 1 г биомассы	Величина молекулярного иона производных аминокислот $[\text{M}]^{+*}$	Количество включенных атомов дейтерия в углеродный скелет молекулы**	Уровень дейтерированности молекул, % от общего количества атомов водорода***
Глицин	9,69	324	2	90,0
Аланин	13,98	340	4	97,5
Валин	3,74	369	4	50,0
Лейцин	7,33	383	5	49,0
Изолейцин	3,64	383	5	49,0
Фенилаланин	3,94	420	8	95,0
Тирозин	1,82	669	7	92,8
Серин	4,90	355	3	86,6
Треонин	5,51	не детектировался	–	–
Метионин	2,25	не детектировался	–	–
Аспарагин	9,59	396	2	66,6
Глутаминовая кислота	10,38	411	4	70,0
Лизин	3,98	632	5	58,9
Аргинин	5,27	не детектировался	–	–
Гистидин	3,72	не детектировался	–	–

* Данные получены для метиловых эфиров 5-(диметиламино)нафтален-1-сульфонил хлоридных (дансильных) производных аминокислот.

** При вычислении уровня дейтерированности протоны (дейтероны) при карбоксильных COOH - и амино NH_2 - группах молекул аминокислот не учитывались из-за легкости диссоциации в $\text{H}_2\text{O}/^2\text{H}_2\text{O}$.

*** Прочерк означает отсутствие данных.

Ростовые и биосинтетические характеристики штамма *B. subtilis* – продуцента рибоксина изучали в протонированной БВК-среде с обычной водой и 2 % БВК дрожжей и ТВ-среде с 98 % $^2\text{H}_2\text{O}$ и 2 % гидролизатом дейтерированной биомассы *B. methylicum* (рис. 2). Во всех опытах отмечена корреляция в характере изменения ростовой динамики *B. subtilis* (рис. 2, кривые 1, 1'), выхода рибоксина (рис. 2, кривые 2, 2') и ассимиляции глюкозы (рис. 2, кривые 3, 3'). Максимальный выход рибоксина (17 г/л) зафиксирован на протонированной БВК-среде при уровне ассимилируемой глюкозы 10 г/л (рис. 2, кривая 2). На ТВ-среде выход рибоксина снижался в 4,4 (3,9 г/л) (рис. 2, кривая 2'), а уровень ассимиляции глюкозы – в 4 раза, о чем показали 40 г/л остаточной не ассимилируемой глюкозы в КЖ (рис. 2, кривая 3'). Экспериментальные данные показали, что при росте в ТВ-среде глюкоза ассимилируется менее эффективно, чем в контрольных условиях.

Ассимиляция глюкозы, г/л

Накопление рибоксина в КЖ, г/л

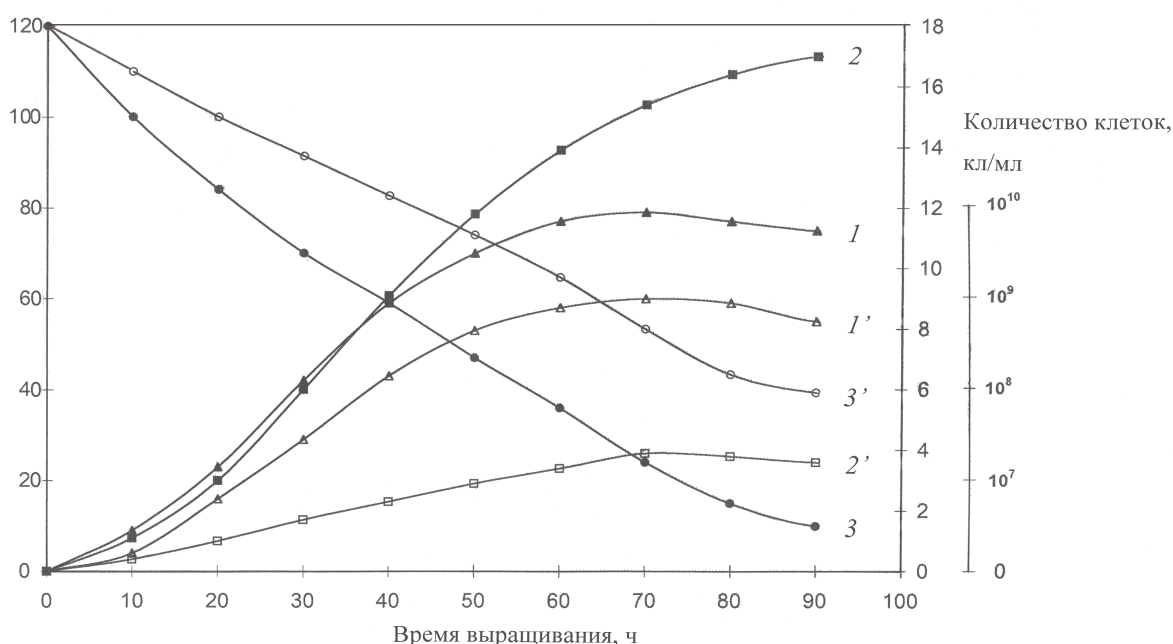


Рис. 2. Динамики роста (кл./мл) *B. subtilis* (1, 1'), накопления рибоксина в КЖ (г/л) (2, 2') и ассимиляции глюкозы (г/л) (3, 3') в различных экспериментальных условиях: 1, 2, 3 — протонированная БВК-среда с 2 %-ным БВК дрожжей; 1', 2', 3' — ТВ-среда с 2 %-ным гидролизатом дейтерированной биомассы *B. methylicum*

Полученный результат требовал изучение содержания глюкозы и других внутриклеточных углеводов в биомассе штамма-производителя *B. subtilis*, осуществленное методом обращенно-фазовой ВЭЖХ на колонке Ultrasorb CN, 10 мкм, 10×250 мм с подвижной фазой ацетонитрил – вода (75 : 25, об.%) (табл. 3). Фракция внутриклеточных углеводов в табл. 3 (нумерация приведена по последовательности их элюирования с колонки) представлена моносахаридами (глюкоза, фруктоза, рамноза, арабиноза), дисахаридами (мальтоза, сахароза), а также четырьмя другими неидентифицированными углеводами с временами удерживания 3,08 (15,63 %), 4,26 (7,46 %), 7,23 (11,72 %) и 9,14 (7,95 %) мин (не показаны). Как ожидалось, выход глюкозы в дейтерированном гидролизате составляет 21,4 % от сух. массы, т. е. выше, чем фруктозы (6,82 %), рамнозы (3,47 %), арабинозы (3,69 %) и мальтозы (11,62 %) (табл. 3). Их выходы существенно не отличались от контроля на H₂O, за исключением сахарозы, которая не детектируется в дейтерированном гидролизате. Уровни дейтерированности углеводов составили от 80,6 % для глюкозы до 90,7 % для арабинозы.

Таблица 3

Качественный и количественный состав внутриклеточных углеводов *B. subtilis* при росте в ТВ-среде и уровни дейтерированности молекул

Углевод	Содержание в биомассе, % от 1 г сухой массы биомассы		Уровни дейтерированности молекул, %*
	Протонированный образец (контроль)	Образец, полученный в ТВ-среде	
Глюкоза	20,01	21,40	80,6
Фруктоза	6,12	6,82	85,5
Рамноза	2,91	3,47	90,3
Арабиноза	3,26	3,69	90,7
Мальтоза	15,30	11,62	–
Сахароза	8,62	не детектировалась	–

* Прочерк означает отсутствие данных

Применение комбинации физико-химических методов для выделения биосинтетического [^2H]рибоксина из КЖ штамма-продуцента диктовалось необходимостью получения инозина высокой степени хроматографической чистоты, не менее 95 %. Поскольку в КЖ наряду с рибоксином присутствуют примеси неорганических солей, белков и полисахаридов, а также сопутствующие вторичные метаболиты нуклеиновой природы (аденозин, гуанозин) и непрореагировавшие субстраты (глюкоза, аминокислоты), проводилось ступенчатое фракционирование КЖ с целью выделения [^2H]рибоксина. Повышенная чувствительность рибоксина к кислотам и щелочам и его нестабильность при выделении требовали использование кислотных и щелочных растворов низкой концентрации, а также проведения выделения при низких температурах, избегая длительного перегрева реакционной смеси. Фракционирование КЖ заключалось в низкотемпературном осаждении высокомолекулярных примесей органическими растворителями — ацетоном и метанолом, адсорбции/десорбции на поверхности активированного угля, экстракции продукта, перекристаллизации и ИОХ. Белки и полисахариды удаляли низкотемпературным осаждением ацетоном при 4 °С, проводя последующую адсорбцию суммы рибонуклеозидов активированным углем на холоде. Десорбированные рибонуклеозиды извлекали из прореагировавшей твердой фазы элюцией этанольно-аммиачным раствором при 60 °С, а сам рибоксин — экстракцией 0,3 М NH_4 -формиатным буфером (рН = 8,9) с последующей перекристаллизацией в 80 % этаноле. Окончательная стадия очистки заключалась в колоночной ИОХ на катионообменнике AG50WX 4, уравновешенном 0,3 М NH_4 -формиатным буфером с 0,045 М NH_4Cl со сбором фракций при $R_f = 0,5$. Данные по выделению рибоксина из КЖ штамма-продуцента представлены в виде спектров УФ-поглощения на рис. 3, кривые 1–3. Наличие в полученном образце (рис. 3, кривая 3) основной полосы поглощения I, соответствующей природному рибоксину ($\lambda_{\text{макс.}} = 249 \text{ нм}$, $\varepsilon_{249} = 7100 \text{ М}^{-1}\cdot\text{см}^{-1}$) и отсутствие вторичных метаболитов II и III доказывает его однородность и эффективность разработанного метода выделения.

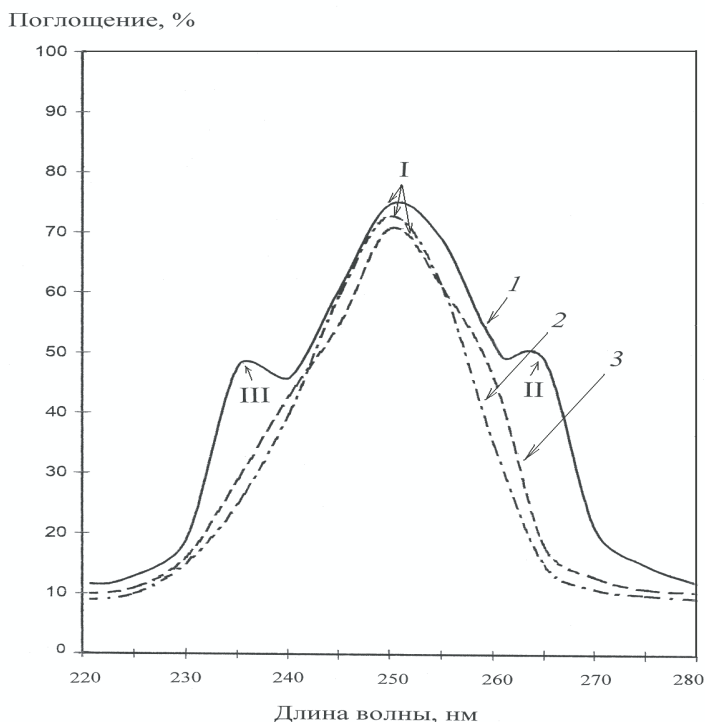
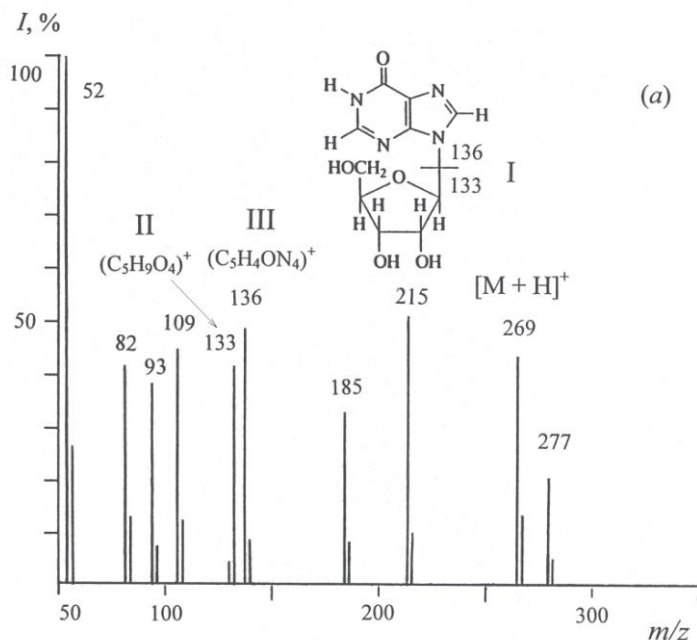


Рис. 3. Спектры УФ-поглощения (%) рибоксина (0,1 н. раствор HCl): 1 — исходная КЖ после выращивания штамма продуцента *B. subtilis* в ТВ-среде; 2 — природный рибоксин; 3 — рибоксин, выделенный из КЖ штамма-продуцента. В качестве контроля использовали природный рибоксин (2): I — рибоксин, II и III — вторичные метаболиты

Уровень дейтерированности рибоксина исследовали методом масс-спектрометрии ББА из-за высокой чувствительности, позволяющей детектировать 10^{-8} – 10^{-10} моль вещества в

пробе, что существенно выше, чем при использовании ^1H ЯМР-спектроскопии [21]. Для этого получали масс-спектры ББА дейтерированного и протонированного рибоксина, по разности величин пиков молекулярных ионов, для которых проводили расчет уровня дейтерированности молекулы. Формирование пика молекулярного иона рибоксина в масс-спектрометрии ББА сопровождался миграцией протона H^+ . Биосинтетический ^2H -меченый рибоксин (масс-спектр ББА приведен на рис. 4, б относительно контроля (рис. 4, а)), представлял смесь изотопнозамещенных форм молекул с различным количеством атомов водорода, замещенных на дейтерий. Поэтому пик молекулярного иона рибоксина $[\text{M} + \text{H}]^+$ полиморфно расщеплялся на отдельные кластеры с примесью молекул со статистическим набором массовых чисел m/z с различным вкладом в суммарный уровень дейтерированности молекулы. Его подсчет проводили по вкладу наиболее интенсивного пика молекулярного иона (пик с наибольшим вкладом в уровень дейтерированности), зарегистрированным в данных условиях масс-спектрометром. Этим условиям удовлетворял пик $[\text{M} + \text{H}]^+$ при m/z 274, 38 % (вместо $[\text{M} + \text{H}]^+$ при m/z 269, 42 % в контрольных условиях (рис. 4, а)), что соответствует включению 5 атомов дейтерия в молекулу рибоксина (рис. 4, б). В пике молекулярного иона рибоксина также фиксировались менее интенсивные пики с примесями молекул с включением 4 (m/z 273, 20 %), 5 (m/z 274, 38 %), 6 (m/z 275, 28 %) и 7 атомов дейтерия (m/z 276, 14 %) (табл. 4).



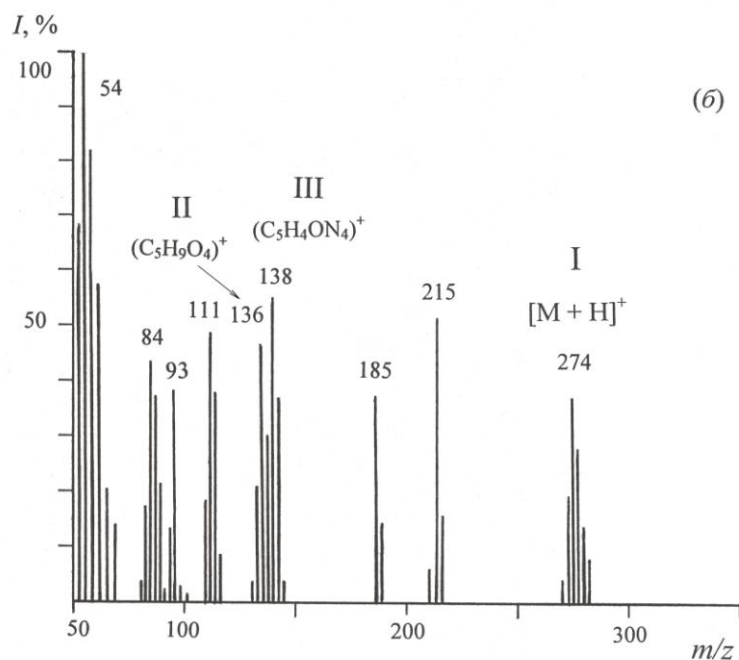


Рис. 4. Масс спектры ББА рибоксина (глицериновая матрица) в различных экспериментальных условиях: *a* — природный рибоксин (контроль); *б* — $[^2\text{H}]$ рибоксин, выделенный из ТВ-среды. Условия ионизации: цезиевый источник, ускоряющее напряжение — 5 кВ, ионный ток — 0,6–0,8 мА. Разрешающая способность — 7500 усл. ед. *I* — относительная интенсивность пиков (%). I — рибоксин, II — рибозный фрагмент, III — гипоксантиновый фрагмент.

Таблица 4

Величины пиков $[M + H]^+$ в масс-спектрах ББА и уровни дейтерированности рибоксина, выделенного с ТВ-среды

Величина пика $[M + H]^+$	Вклад в уровень дейтерированности, мол.%	Количество атомов дейтерия	Уровень дейтерированности, % от общего количества атомов водорода*
273	20	4	20,0
274	38	5	62,5
275	28	6	72,5
276	14	7	87,5

* При вычислении уровня дейтерированности протоны (дейтероны) при гидроксильных OH-группах, а также имидазольные NH-протоны при гетероатомах азота не учитывались из-за легкости диссоциации в $\text{H}_2\text{O}/^2\text{H}_2\text{O}$.

С учетом вклада пиков молекулярных ионов суммарный уровень дейтерированности (УД) молекулы $[^2\text{H}]$ рибоксина, вычисленный по нижеприведенной формуле, составил 62,5 % от общего количества атомов водорода в углеродном скелете молекулы.

$$\text{УД} = \frac{[M]^{+r_1} C_1 + [M]^{+r_2} C_2 + \dots + [M]^{+r_n} C_n}{\sum C_n},$$

где $[M]^{+r}$ — величины пиков молекулярного иона рибоксина; C_n — вклад в уровень дейтерированности молекулы, мол. %.

Более точную информацию о распределении дейтерия в молекуле рибоксина дает фрагментация молекулы, показанная на рис. 5. Пути фрагментации молекулы рибоксина методом БА приводят к распаду рибоксина I на фрагмент рибозы II при массовом соотношении m/z 133 и гипоксантиновый фрагмент III при m/z 136 (их распад сопровождается миграцией протона H^+), который в свою очередь расщепляется на ряд менее низкомолекулярных осколочных фрагментов при m/z 109, 108, 82, 81 и 54 за счет элиминирования HCN и CO из гипоксантина (рис. 5). Следовательно, присутствие в масс-спектре БА рибоксина двух “тяжелых” пиков фрагментов рибозы II m/z 136, 46 % (вместо m/z 133, 41 %) и гипоксантина III m/z 138, 55 % (вместо m/z 136, 48 %), а также пиков низкомолекулярных фрагментов, продуктов распада гипоксантина при m/z 111, 49 % (вместо m/z 109, 45 %) и m/z 84, 43 % (вместо m/z 82, 41 %) свидетельствует о включении трех атомов дейтерия в рибозный и двух атомов дейтерия в гипоксантиновый фрагменты молекулы рибоксина (рис. 4 и рис. 5). Таким образом, экспериментальные данные свидетельствуют о включении 5 атомов дейтерия по 1',3',4',2,8 положениям молекулы рибоксина, что подтверждается 1H ЯМР-спектроскопией.

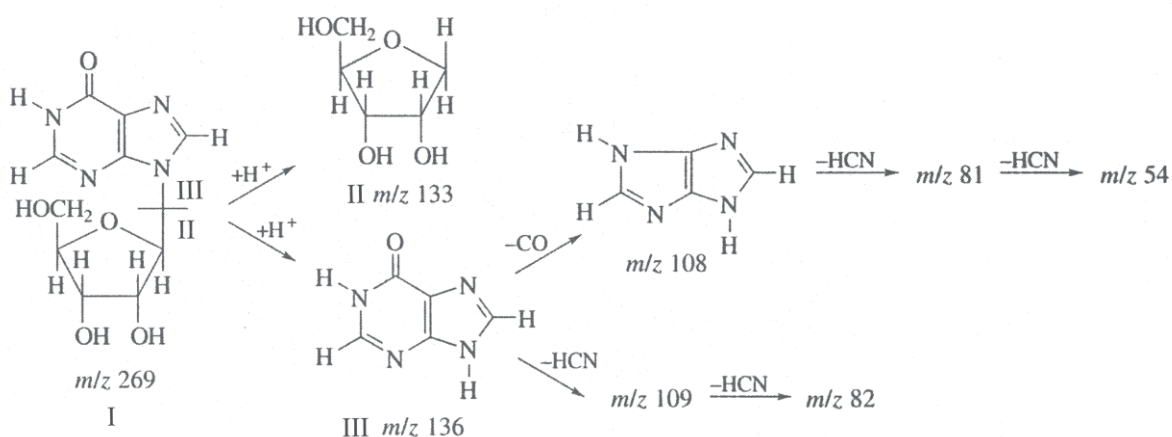


Рис. 5. Схема фрагментации молекулы рибоксина методом БА

При анализе дейтерированности рибоксина учитывалось, что уровень и характер включения дейтерия в молекулу определялся способом получения дейтерированного рибоксина микробиологическим синтезом. Вследствие того, что протоны (дейтероны) в C_1 – C_2 положениях рибозного фрагмента молекулы рибоксина могли происходить из глюкозы, характер биосинтетического включения дейтерия в рибозный фрагмент определяется, в основном, функционированием процессов гексозо-6-монофосфатного (ГМФ) шунта, связанного с ассимиляцией глюкозы и других углеводов. Поскольку глюкоза использовалась в протонированном виде, ее вклад в уровень дейтерированности рибозного фрагмента пренебрегался. Однако, вопреки этому предположению, наблюдалось включение дейтерия в рибозный фрагмент молекулы рибоксина за счет сохранения минорных путей биосинтеза глюкозы *de novo*. Многочисленные (1H – 2H) обменные процессы также могли привести к специфическому включению атомов дейтерия по определённым положениям в молекуле рибоксина. Такими доступными положениями в молекуле рибоксина являются гидроксильные протоны (OH^-) и имидазольные протоны при гетероатомах NH^+ , которые могут обмениваться на дейтерий в 2H_2O за счет кето-енольной таутомерии. Три атома дейтерия в рибозном фрагменте молекулы рибоксина могли происходить за счет функционирования реакций ГМФ-шунта, два атома дейтерия в положениях C_2, C_8 в гипоксантиновом фрагменте могли синтезироваться *de novo* за счет [2H]аминокислот, источником которых являлся метилотрофный гидролизат. В частности, гликозидный протон в положении C_1 в рибозном фрагменте (β - N_9 -гликозидная связь) мог заместиться на дейтерий в процессе реакции элиминирования CO_2 на стадии образования рибулозо-5-монофосфата из 3-кето-6-фосфоглюконовой кислоты с последующим присоединением протона (дейтерона) по C_1 -положению рибулозо-5-монофосфата. Два других протона в положениях $C_2(C_3)$ и C_4 в рибозном фрагменте молекулы могли заместиться на дейтерий в

результате изомеризации рибулозо-5-монофосфата в рибозо-5-монофосфата. В целом, наши исследования подтверждают эту схему. Однако следует подчеркнуть, что уровень дейтерированности рибоксина определяется изотопной чистотой $^2\text{H}_2\text{O}$ и дейтерированных субстратов.

Заключение. Продемонстрирована эффективность использования в гидролизата биомассы факультативных метилотрофных бактерий *B. methylicum*, полученной с максимально дейтерированной ростовой среды для микробиологического синтеза [^2H]рибоксина штаммом грамположительных хемогетеротрофных бактерий *B. subtilis*. Выход [^2H]рибоксина на максимально дейтерированной среде с 2 %-ным гидролизатом ^2H -меченой биомассы *B. methylicum* составил 3,9 г/л, а уровень дейтерированности — 62,5 % (5 атомов с включением 3 атомов дейтерия в рибозный и 2 атомов дейтерия в гипоксантиновый фрагменты молекулы). Для достижения более высокого уровня дейтерированности конечного продукта необходимо тщательным образом контролировать изотопный состав ростовой среды и исключить все источники дополнительных протонов, в т.ч. использовать [^2H]глюкозу. В будущем планируется получать разработанным методом другие дейтерированные природные нуклеозиды.

Примечания:

1. Andres H. Synthesis and Applications of Isotopically Labelled Compounds / Eds. U. Pleiss, R. Voges. N.Y.: John Wiley & Sons, 2001. Vol. 7. 728 p.
2. Kundu M.T. Synthetic studies to improve the deuterium labelling in nucleosides for facilitating structural studies of large RNAs by high-field NMR spectroscopy / M.T. Kundu, A. Trifonova, Z. Dinya, A. Foldes, J. Chattopadhyaya // Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids. 2001. Vol. 20, № 4–7. P. 1333–1337.
3. Kushner D.J. Pharmacological uses and perspectives of heavy water and deuterated compounds / D.J. Kushner, A. Baker, T.G. Dunstall // Can. J. Physiol. Pharmacol. 1999. Vol. 77, № 2. P. 79–88.
4. Chen B., Jamieson E. R., Tullius T. D. A general synthesis of specifically deuterated nucleotides for studies of DNA and RNA / B. Chen, E.R. Jamieson, T.D. Tullius // Bioorg. & Med. Chem. Lett. 2002. Vol. 12. P. 3093–3096.
5. Jung M.E. Efficient synthesis of specifically deuterated nucleosides: preparation of 4'-deuteriothymidine / M.E. Jung, Y. Xu // Cheminform Abstract. 1998. Vol. 29, № 16. P. 235–238.
6. Daub G.H. Organic synthesis with stable isotopes // Stable Isotopes: Proc. 3d Intern. Conference / Ed. E.R. Klein. New York: Acad. Press, 1979. P. 3–10.
7. Huang X. An efficient and economic site-specific deuteration strategy for NMR studies of homologous oligonucleotide repeat sequences / X. Huang, P. Yu, E. LeProust, X. Gao // Nucleic Acids Res. 2006. Vol. 25, № 23. P. 4758–4763.
8. Miroshnikov A.I. A new strategy for the synthesis of nucleosides: one-pot enzymatic transformation of D-pentoses into nucleosides / A.I. Miroshnikov, R.S. Esipov, T.I. Muravyova, I.D. Konstantinova, I.V. Fateev, I.A. Mikhailopulo // Open Conf. Proc. Journal. 2010. Vol. 1. P. 98–102.
9. Mosin O.V. Biosynthesis of ^2H -labeled phenylalanine by a new methylotrophic mutant *Brevibacterium methylicum* / O.V. Mosin, D.A. Skladnev, V.I. Shvets // Biosci., Biotechnol., Biochem. 1999. Vol. 62, № 2. P. 225–229.
10. Денько Е.И. Действие тяжёлой воды (D_2O) на клетки животных, растений и микроорганизмы / Е.И. Денько // Усп. совр. биол. 1970. Т. 70, № 4. С. 41–49.
11. Vertes A. Physiological effect of heavy water. Elements and isotopes: formation, transformation, distribution. Vienna: Dordrecht: Kluwer Acad. Publ., 2003. 112 p.
12. Лобышев В.Н. Изотопные эффекты D_2O в биологических системах / В.Н. Лобышев, Л.П. Калиниченко. Москва: Наука, 1978. 120 с.
13. Trotsenko Y.A. The ribulose monophosphate (Quayle) cycle: News and views / Y.A. Trotsenko, V.N. Khmelena, A.P. Beschastny // Microbial Growth on C1 Compounds: Proc. 8th Intern. Sympos / Eds. M.E. Lindstrom, F.R. Tabita. Boston: Kluwer Acad. Publ., 1995. P. 24–26.
14. Skladnev D.A. Conversion of stable isotope labeled methanol to components of bacterial biomass / D.A. Skladnev, Y.D. Tsygankov // 6 th Eur. Conf. of Biomass for Energy, Athens: Elsevier, 1991. P. 234–235.
15. Мосин О.В. Изучение биосинтеза аминокислот штаммом *Brevibacterium methylicum* на средах, содержащих тяжелую воду и дейтеро-метанол / О.В. Мосин, Д.А. Складнев, Т.А. Егорова, В.И. Швец // Биотехнология. 1996. № 3. С. 3–12.

16. Мосин О.В. Биосинтез ^2H -меченого инозина бактерией *Bacillus subtilis* / О.В. Мосин, Д.А. Складнев, В.И. Швеиц // Известия РАН. Сер. биол. 1999. № 4. С. 1–10.
17. Mosin O.V. Microbial synthesis of ^2H -labelled L-phenylalanine with different levels of isotopic enrichment by a facultative methylotrophic bacterium *Brevibacterium methylicum* with RuMP assimilation of carbon / O.V. Mosin, V.I. Shvets, D.A. Skladnev, I. Ignatov // Biochemistry (Moscow) Supplement Series B: Biomedical Chemistry. 2013. Vol. 7, № 3. P. 249–260.
18. Mosin O.V. Microbiological synthesis of ^2H -labeled phenylalanine, alanine, valine, and leucine/isoleucine with different degrees of deuterium enrichment by the Gram-positive facultative methylotrophic bacterium *Brevibacterium methylicum* / O.V. Mosin, I. Ignatov // International Journal of Biomedicine. 2013. Vol. 3, № 2. P. 132–138.
19. Мосин О.В. Изучение микробного синтеза дейтерированного L-фенилаланина метилотрофной бактерией *Brevibacterium methylicum* на средах с различным содержанием тяжелой воды / О.В. Мосин, В.И. Швеиц, Д.А. Складнев, И. Игнатов // Биофармацевтический журнал. 2012. № 4. С. 11–22.
20. Lindstrom M.E., Stirling D.I. Methylotrophs: genetics and commercial applications / M.E. Lindstrom, D.I. Stirling // Annual Review of Microbiology. 1990. Vol. 4. P. 27–58.
21. Caprioli R.M. Continuous-flow fast atom bombardment mass spectrometry. New York: Wiley, 1990. 125 p.

References:

1. Andres H. Synthesis and Applications of Isotopically Labelled Compounds / Eds. U. Pleiss, R. Voges. N.Y.: John Wiley & Sons, 2001. Vol. 7. 728 p.
2. Kundu M.T. Synthetic studies to improve the deuterium labelling in nucleosides for facilitating structural studies of large RNAs by high-field NMR spectroscopy / M.T. Kundu, A. Trifonova, Z. Dinya, A. Foldes, J. Chattopadhyaya // Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids. 2001. Vol. 20, № 4–7. P. 1333–1337.
3. Kushner D.J. Pharmacological uses and perspectives of heavy water and deuterated compounds / D.J. Kushner, A. Baker, T.G. Dunstall // Can. J. Physiol. Pharmacol. 1999. Vol. 77, № 2. P. 79–88.
4. Chen B., Jamieson E. R., Tullius T. D. A general synthesis of specifically deuterated nucleotides for studies of DNA and RNA / B. Chen, E.R. Jamieson, T.D. Tullius // Bioorg. & Med. Chem. Lett. 2002. Vol. 12. P. 3093–3096.
5. Jung M.E. Efficient synthesis of specifically deuterated nucleosides: preparation of 4'-deuteriothymidine / M.E. Jung, Y. Xu // Cheminform Abstract. 1998. Vol. 29, № 16. P. 235–238.
6. Daub G.H. Organic synthesis with stable isotopes // Stable Isotopes: Proc. 3d Intern. Conference / Ed. E.R. Klein. New York: Acad. Press, 1979. P. 3–10.
7. Huang X. An efficient and economic site-specific deuteration strategy for NMR studies of homologous oligonucleotide repeat sequences / X. Huang, P. Yu, E. LeProust, X. Gao // Nucleic Acids Res. 2006. Vol. 25, № 23. P. 4758–4763.
8. Miroshnikov A.I. A new strategy for the synthesis of nucleosides: one-pot enzymatic transformation of D-pentoses into nucleosides / A.I. Miroshnikov, R.S. Esipov, T.I. Muravyova, I.D. Konstantinova, I.V. Fateev, I.A. Mikhailopulo // Open Conf. Proc. Journal. 2010. Vol. 1. P. 98–102.
9. Mosin O.V. Biosynthesis of ^2H -labeled phenylalanine by a new methylotrophic mutant *Brevibacterium methylicum* / O.V. Mosin, D.A. Skladnev, V.I. Shvets // Biosci., Biotechnol., Biochem. 1999. Vol. 62, № 2. P. 225–229.
10. Den'ko E.I. Influence of heavy water (D_2O) on cells of animals, plants and microorganisms / E.I. Den'ko // Usp. Sovr. Biol. 1970. Vol. 70, № 4. P. 41–49.
11. Vertes A. Physiological effect of heavy water. Elements and isotopes: formation, transformation, distribution. Vienna: Dordrecht: Kluwer Acad. Publ., 2003. 112 p.
12. Lobishev V.N. Isotopic effects in biological systems / V.N. Lobishev, L.P. Kalinichenko. Moscow: Nauka, 1978. 120 p.
13. Trotsenko Y.A. The ribulose monophosphate (Quayle) cycle: News and views / Y.A. Trotsenko, V.N. Khmelenina, A.P. Beschastny // Microbial Growth on C1 Compounds: Proc. 8th Intern. Sympos / Eds. M.E. Lindstrom, F.R. Tabita. Boston: Kluwer Acad. Publ., 1995. P. 24–26.
14. Skladnev D.A. Conversion of stable isotope labeled methanol to components of bacterial biomass / D.A. Skladnev, Y.D. Tsygankov // 6 th Eur. Conf. of Biomass for Energy, Athens: Elsevier, 1991. P. 234–235.

15. Mosin O.V. Studying of biosynthesis of amino acids by the strain of *Brevibacterium methylicum* at growth on media, containing heavy water and deuteromethanol / O.V. Mosin, D.A. Skladnev, T.A. Egorova, A.M. Yurkevich, V.I. Shvets // *Biotechnologija*. 1996. № 3. P. 3–12.
16. Mosin O.V. Biosynthesis of ^2H -labelled inosine by bacterium *Bacillus subtilis* / O.V. Mosin, D.A. Skladnev, V.I. Shvets // *Izv. RAN. Ser. Biol.* 1999. № 4. P. 1–10.
17. Mosin O.V. Microbial synthesis of ^2H -labelled L-phenylalanine with different levels of isotopic enrichment by a facultative methylotrophic bacterium *Brevibacterium methylicum* with RuMP assimilation of carbon / O.V. Mosin, V.I. Shvets, D.A. Skladnev, I. Ignatov // *Biochemistry (Moscow) Supplement Series B: Biomedical Chemistry*. 2013. Vol. 7, № 3. P. 249–260.
18. Mosin O.V. Microbiological synthesis of ^2H -labeled phenylalanine, alanine, valine, and leucine/isoleucine with different degrees of deuterium enrichment by the Gram-positive facultative methylotrophic bacterium *Brevibacterium methylicum* / O.V. Mosin, I. Ignatov // *International Journal of Biomedicine*. 2013. Vol. 3, № 2. P. 132–138.
19. Mosin O.V. Studying of microbic synthesis of deuterium labeled L-phenylalanine by methylotrophic bacterium *Brevibacterium methylicum* on media with different content of heavy water / O.V. Mosin, V.I. Shvets, D.A. Skladnev, I. Ignatov // *Russian Journal of Biopharmaceuticals*. 2012. № 4. P. 11–22.
20. Lindstrom M.E., Stirling D.I. Methylotrophs: genetics and commercial applications / M.E. Lindstrom, D.I. Stirling // *Annual Review of Microbiology*. 1990. Vol. 4. P. 27–58.
21. Caprioli R.M. Continuous-flow fast atom bombardment mass spectrometry. New York: Wiley, 1990. 125 p.

УДК 579.871.08

Использование грамположительной хемогетеротрофной бактерии *Bacillus subtilis* B-3157 с ГМФ-циклом ассимиляции углерода для микробиологического синтеза [^2H]рибоксина высокого уровня дейтерированности

¹ Олег Викторович Мосин

² Игнат Игнатов

³ Дмитрий Анатольевич Складнев

⁴ Виталий Иванович Швец

¹ Московский государственный университет прикладной биотехнологии, Российская Федерация
Старший научный сотрудник кафедры биотехнологии, канд. хим. наук
103316, Москва, ул. Талалихина, 33
E-mail: mosin-oleg@yandex.ru

² Научно-исследовательский центр медицинской биофизики (РИЦ МБ), Болгария
Профессор, доктор наук Европейской академии естественных наук (ФРГ), директор НИЦ МБ.

1111, София, ул. Н. Коперника, 32/6

E-mail: mbioph@dir.bg

³ Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов ГосНИИГенетика, Российская Федерация
Профессор, доктор биол. наук, ведущий научный сотрудник ГосНИИГенетика

117545, Москва, 1-й Дорожный пр., 1

E-mail: genetika@genetika.ru

⁴ Московский государственный университет тонких химических технологий им. М.В. Ломоносова, Российская Федерация
Академик РАН, доктор химических наук

117571, Москва, Вернадского просп., 86

E-mail: mitht@mitht.ru

Аннотация. Изучены ростовые и биосинтетические характеристики штамма грамположительных хемогетеротрофных бактерий *Bacillus subtilis* B-3157 – продуцента ^2H -меченого пуринового рибонуклеозид рибоксина (выход – 3,9 г/л) в тяжеловодородной

среде высокого уровня дейтерированности (99,8 ат.% ^2H) с 2 %-ным гидролизатом дейтерированной биомассы факультативной метилотрофной бактерии *Brevibacterium methylicum* B-5662 как источника ^2H -меченых ростовых субстратов, полученной в минимальной среде M9 с 98 % $^2\text{H}_2\text{O}$ и 2 % [^2H]метанолом. Выделение [^2H]рибоксина из КЖ штамма-продуцента производили адсорбцией/десорбцией) на поверхности активированного угля, экстракцией 0,3 М NH_4 -формиатным буфером (рН = 8,9) с последующей перекристаллизацией в 80 % этаноле и колоночной ионообменной хроматографии на катионообменнике AG50WX 4, уравновешенным 0,3 М NH_4 -формиатным буфером с 0,045 М NH_4Cl (выход рибоксина 3,1 г/л (80 %)). Уровень дейтерированности биосинтетического [^2H]рибоксина, исследованный методом масс-спектрометрии с бомбардировкой быстрыми атомами (ББА), составил 5 атомов дейтерия (62,5 % ^2H) с включением 3 атомов дейтерия в рибозный и 2 атомов дейтерия в гипоксантиновый фрагменты молекулы.

Ключевые слова: *Vacillus subtilis*; [^2H]рибоксин; биосинтез; тяжелая вода; масс-спектрометрия ББА.

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 581.1:631.531.027.3:631.559:581.143

**Effect of Pulse Pressure Treatment on Content of Protein
and Some Sugars in Wheat Seeds**

¹Violetta Pavlova
²Ekaterina Vasichkina
³Sergey Belopuhov
⁴Alexey Kolotvin
⁵Vladimir Lysak

¹ Volgograd State Technical University, Russian Federation
400005, Volgograd, Lenin avenue, 28
Post-graduate student

E-mail: Violetta_Mir@mail.ru

² Volgograd State Technical University, Russian Federation
400005, Volgograd, Lenin avenue, 28
Post-graduate student

E-mail: vasichkinaev@yandex.ru

³ Russian State Agrarian University-MAA Timiryazev, Russian Federation
Professor, D. Sc. (Agriculture)

127550, Moscow, Timiryazevskaya street, 49

E-mail: belopuhov@mail.ru

⁴ Samara State University, Russian Federation
Scientific associate

443011, Samara, Ak. Pavlov street, 1

E-mail: kolotvin_alex@rambler.ru

⁵ Volgograd State Technical University, Russian Federation
Professor, D. Sc. (Engineering)

400005, Volgograd, Lenin avenue, 28

E-mail: lysak@vstu.ru

Abstract. Seeds of hard wheat (*Triticum durum*) were treated by pulse pressure (PP), generated by shock wave. Protein content was determined by spectroscopy in the nearest infrared point of the spectrum (NIR). HPLC was used for determining glucose level in samples. Moisture of control seeds was 14.2%. It was not changed in PP 11 MPa samples and was decreased by PP 29 MPa (12.8%); that indicated the damage of seeds. Protein content in control sample was 16.5%. The index was not changed by PP 11 MPa (16.9%), but it increased under PP 29 MPa (17.2%) due to the degradation of starch and relative elevation of protein level. Glucose content in PP 11 MPa samples was less than the control level, probably, due to the acceleration of amino-carbonyl reaction. PP 29 MPa promoted the increase of glucose content due to non-enzymatic starch hydrolysis activation. Thus PP 11 MPa made minor damages without the accumulation of glucose, but PP 29 MPa promoted the ageing due to the accumulation of glucose.

Keywords: pulse pressure; protein content; glucose content; starch hydrolysis.

Введение.

Быстрое ухудшение состояния семян при старении или действии различных факторов связывают с ослаблением стеклообразного состояния биополимеров, гидролизом углеводов и множеством окислительных процессов [1, 6, 8].

При хранении семян протекают термодинамически разрешенные неферментативные процессы, приводящие к старению семян. Таким процессом является неферментативный гидролиз крахмала [2]. По данным Locher и Bucheli [4], в семенах сои при хранении в течение 160 дней при 30°C и 82% относительной влажности воздуха гидролизуется 50 мг·г⁻¹ сырой массы олигосахаридов (вербаскозы, стахиозы, раффинозы) и сахарозы до моносахаров.

При гидролизе полисахаридов происходит внутриклеточное перераспределение воды: некоторая доля связанной воды включается в структуру продуктов (в виде атома Н или группы ОН). При полном гидролизе крахмала в состав сухого вещества может включиться масса воды, составляющая 11,1 % от массы крахмала [2]. Помимо крахмала, гидролизу могут подвергаться другие полимерные вещества [3, 17].

Тем самым, при каждом акте гидролиза в структуру продуктов реакции переходит вода. Исследования [7] показывают, что воздушно-сухие семена содержат много олигосахаридов, в том числе сахарозы, и их содержание снижается при старении.

Старение биополимеров сопровождается их обезвоживанием [16]. Содержание воды в семенах за счет неферментативного гидролиза снижается на 0,5 %. Поскольку в воздушно-сухих семенах нет свободной воды, а вода в воздушно-сухих семенах является, в основном, связанной [8], то для гидролиза расходуется гидратная вода, что приводит к уменьшению влажности семян. В процессе гибели содержание воды уменьшается на 1,5–2 %, т.е. теряется пятая часть связанной воды, что отражает необратимые перестройки макромолекул, сопровождающиеся уменьшением их водоудерживающей способности. Всхожесть семян зависит от их влажности [8].

Возникшие в семенах при неферментативном гидролизе восстанавливающие сахара вступают в реакции с белками и аминокислотами – амино-карбонильную реакцию или реакцию гликозилирования. Роль амино-карбонильной реакции (Амадори-Майяра) в старении семян доказана рядом исследований [5, 6]. Отмечено, что малое содержание восстанавливающих сахаров в сухих семенах является защитой от неферментативной амино-карбонильной реакции.

Известно, что при хранении зерна пшеницы фракционный состав белков не менялся в течение 3-4 лет, а затем происходило снижение гидрофильных свойств и агрегации белковых молекул. Растворимость белков пшеницы понизилась с одновременным повышением содержания аминного азота и уменьшением содержания азота «истинного» белка [3]. Снижение растворимости белков связано также со снижением их водоудерживающих свойств.

Процессы старения в области влажностей семян от 6 до 15 % определяются протеканием неферментативной амино-карбонильной реакции. Конечные продукты реакции труднорастворимы, устойчивы к протеолитическому расщеплению, химически активны и способны образовывать внутримолекулярные сшивки, ковалентно связывать белки, а также некоторые другие вещества, имеющие свободные аминогруппы (ДНК, некоторые липиды), химически инактивировать окись азота (NO) [9, 12].

Таким образом, старение семян сопровождается снижением содержания углеводов и белка, и скорость убыли этих веществ может служить параметром измерения скорости старения семян. Целью исследования было выявление названных признаков старения семян после действия импульсного давления.

Материалы и методы.

Семена пшеницы твердой (*Triticum durum*) обрабатывали импульсным давлением (ИД) 11 и 29 МПа, создаваемым ударной волной; ИД способствует изменению процессов прорастания семян и увеличению продуктивности растений [11, 19, 20].

Партии семян взвешивали, после чего высушивали при температуре 130°C до постоянного веса, вновь взвешивали и по изменению массы рассчитывали содержание воды (влажность), которое выражали в процентах.

Измерение содержания протеина проводили через 1 месяц после обработки импульсным давлением. Определение осуществляли методом ближней ИК-спектроскопии. Метод основан на поглощении энергии специфических длин волн пептидными связями между аминокислотами в молекулах белка, группами ОН молекул крахмала и связями О-Н молекул воды [13]. Метод ближней инфракрасной спектроскопии обладает экспрессностью, высокой точностью и воспроизводимостью. Отклонение данного метода от стандартного метода Кьельдаля (ГОСТ 10846-74) составляет не более 0,5 % [15].

Содержание растворимых сахаров определяли методом ВЭЖХ. Для выделения сахаров навеску семян пшеницы массой 1 г растирали, сахара экстрагировали 70%-ным водным этанолом в течение 20 минут при кипячении. Охлажденную смесь центрифугировали, из супернатанта выпаривали этиловый спирт, полученный раствор отфильтровали. Перед вводом в колонку образец растворили в смеси растворителей ацетонитрил/вода (50/50) и профильтровали через PTFE мембранный фильтр 0,45 мкм.

Анализ проводили на приборе ВЭЖХ Agilent 1260, оборудованном 4-х градиентным насосом, автосамплером, вакуумным дегазатором, рефрактометрическим детектором. Условия хроматографирования: колонка Zorbax NH₂, 250 мм x 4,6 мм, 5 мкм, предколонка Zorbax NH₂, 5 мкм, подвижная фаза ацетонитрил/вода (72/28, v/v), температура колонки 35°C, скорость потока подвижной фазы 1,4 мл·мин⁻¹ (обратное давление 84 бар), объем образца 50 мкл.

Обсуждение результатов

После обработки ИД семена теряли часть связанной воды или быстро включали ее в состав сухого вещества в процессе гидролиза. Из рис. 1а видно, что влажность воздушно-сухих семян в контроле составляла 14,2 %, практически не изменилась при ИД 11 МПа и снизилась при ИД 29 МПа (12,8 %) по сравнению с контролем. Полученные результаты указывают на повреждение семян [8].

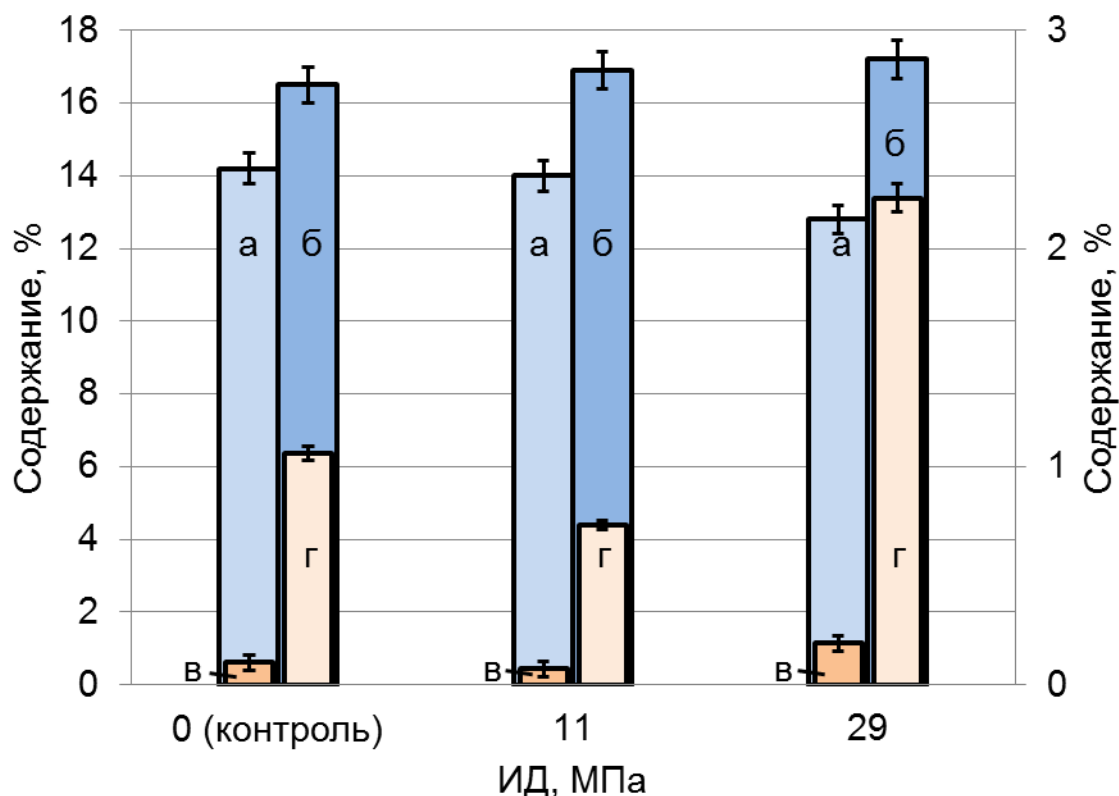


Рис. 1. Влияние ИД на содержание веществ в семени пшеницы
 По левой оси: а – вода (влажность), б – протеин через 1 месяц после обработки;
 По правой оси: в – глюкоза, г – сахароза.

Начальное содержание протеина в пшенице контрольного образца составляло 16,5 % (рис. 1б). Через месяц после обработки ИД 11 МПа содержание протеина осталось практически неизменным (16,9 %), а после обработки ИД 29 МПа возросло (17,2 %). Это явление можно объяснить ускорением гидролиза крахмала до глюкозы и, как следствие, снижением сухой массы семян с относительным повышением содержания протеина. Видимо, молекулы белка оказались более устойчивыми к неферментативному гидролизу, чем молекулы крахмала.

Из рис. 1в видно, что содержание глюкозы в образцах, полученных при обработке ИД величиной 11 МПа, ниже контрольного. Это может быть связано как со снижением скорости реакции гидролиза крахмала, так и с ускорением протекания неферментативной аминокарбонильной реакции. Последнее явление представляется более вероятным. Из рис. 1г видно, что содержание сахарозы при ИД 11 МПа также снижается. Сахароза не является восстанавливающим сахаром, не вступает в аминокарбонильную реакцию, но может гидролизироваться без участия ферментов до глюкозы и сахарозы, причем глюкоза будет вступать в аминокарбонильную реакцию. Снижение содержания глюкозы и сахарозы в данном случае указывает на повреждение семян. Поскольку содержание протеина и воды изменяется незначительно, уровень повреждений невысок, такие незначительные повреждения при выходе семян из состояния покоя могут вызвать реакцию гиперстимуляции.

Обработка семян ИД 29 МПа приводит к повышению содержания глюкозы и сахарозы в семенах пшеницы (рис. 1в, г). Это связано с появлением микротрещин в молекулах крахмала и ускорением неферментативного гидролиза крахмала до глюкозы. В сухих семенах глюкоза присутствует в следовых количествах в циклической форме, т.е. химически мало активна. При неферментативном гидролизе углеводов в качестве промежуточной формы образуются моносахара в линейной форме, обладающие редуцирующими свойствами. Содержание протеина не изменяется, следовательно, гликозилирование вначале не сопровождается деполимеризацией полипептидной цепи. Однако, снижение гидрофобности биополимеров и снижение влажности семян на 1,4 % по сравнению с контролем указывает на существенные повреждения.

Заключение.

Таким образом, в семенах при старении параллельно протекают 2 процесса: снижение содержания крахмала (путем неферментативного гидролиза до глюкозы) и снижение содержания протеина. Обработка семян ИД влияет на процессы старения. В зависимости от величины ИД влияние может быть различным. ИД 11 МПа оставляет слабые повреждения без накопления глюкозы как промежуточного продукта, ИД 29 МПа способствует ускорению процессов старения за счет разрушения молекул крахмала и накопления глюкозы.

Примечания:

1. Bernal-Lugo, I. Changes in soluble carbohydrates during seed storage/ I. Bernal-Lugo, A.C. Leopold // *Plant Physiol.* 1992. V. 98. P. 1207-1210.
2. Influence of Pulse Pressure on the State of Biopolymers and the Probability of Hydrolysis of Starch in Seeds [Electronic resource] / Pavlova V.A., Vasichkina E.V., Nefed'eva E.E., Lysak V.I. // *European Journal of Molecular Biotechnology.* 2013. Vol. 1, № 1. С. 38-44. - URL : http://ejournal8.com/journals_n/1386101296.pdf.
3. Jones, D.B. Gersdorff C.E.F. The effect of storage on the proteins of wheat, white flour and whole-wheat flour// *Cereal Chem.* 1941. № 18. P. 417.
4. Locher R., Bucheli P. Comparison of Soluble Sugar Degradation in Soybean Seed under Simulated Tropical Storage Conditions // *Crop Sci.* 1998. V. 38. P. 1229-1235.
5. Murthy U.M.N., Sun W.Q. Protein Modification by Amadori and Maillard Reaction during Seed Storage: Roles of Sugar Hydrolysis and Lipid Peroxidation // *J. Exp. Bot.* 2000. V. 51. P. 1221-1228.
6. Sun W.Q., Leopold A.C. The Maillard Reaction and Oxidative Stress during Aging of Soybean Seeds // *Physiol. Plant.* 1995. V. 94. P. 94-104.
7. Veselova, T.V. Possible Involvement of Aquaporins in Water Uptake by Pea Seeds Differing in Quality / T.V. Veselova, V.A. Veselovsky // *Russian Plant Physiology.* 2006. Vol. 53, №1. P. 96-101.

8. Veselovsky, V.A. Lipid Peroxidation, Carbohydrate Hydrolysis, and Amadori-Maillard Reaction at Early Stages of Dry Seed Aging / V.A. Veselovsky, T.V. Veselova // Russian Plant Physiology. 2012. Vol. 59. № 6. p. 811-817.
9. Anisimov V.N. Molekulyarnye i fiziologicheskie mekhanizmy stareniya/ V.N. Anisimov. SPb: «Nauka», 2003. 468 s.
10. Bartenev, G.M. Fizika polimerov / G.M. Bartenev, S.Ya. Frenkel' / Pod red. d-ra fiz.-mat. nauk A.M. El'yashevicha. L.: Khimiya, 1990. 432 s.
11. Konstruktsii ustroystv dlya predpsevnoi obrabotki semyan davleniem / Fomichenko V.V., Golovanchikov A.B., Belopukhov S.L., Nefed'eva E.E. // Izv. vuzov. Prikladnaya khimiya i biotekhnologiya. 2012. № 2. C. 128-131.
12. Kudinov Yu.G. Patologicheskie posledstviya nakopleniya konechnykh produktov nefermentativnogo glikozilirovaniya pri starenii // Probl. stareniya i dolgoletiya. 1994. T. 4. S. 434-451.
13. Metodika analiza zerna i zernoproduktov metodom spektroskopii otrazheniya v blizhnei infrakrasnoi oblasti (NIR). Rekomendatsiya ICC № 202 (International Association for Cereal Science and Technology - Mezhdunarodnoe obshchestvo po khimii zerna).
14. Nefed'eva E.E. Influence of Pulse Pressure on Seed Quality and Yield of Buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench.) [Electronic resource] / E.E. Nefed'eva, T.V. Veselova, V.A. Veselovskii, V.I. Lysak // European Journal of Molecular Biotechnology. 2013. Vol. 1, № 1. C. 12-27. - URL : http://ejournal8.com/journals_n/1386100830.pdf.
15. Pankov, S.A., Borzenko, A.G. Ispol'zovanie blizhnei infrakrasnoi spektroskopii dlya analiza zerna pshenitsy // Vestn. Mosk. un-ta. Seriya 2: Khimiya. –T. 47. - № 3.- S. 174-176.
16. Serami E., Vlassara Kh., Braunli M. Glyukoza i starenie // V mire nauki. 1987. № 7. S. 42-49.
17. Soderzhanie prolina v prorastayushchikh semenakh grechikhi i ikh kachestvo pri deistvii impul'snogo davleniya i ponizhennykh temperatur / Shilenkov A.V., Mazei N.G., Nefed'eva E.E., Khryanin V.N. // Sel'skokhozyaistvennaya biologiya. Seriya «Biologiya rastenii». 2008. № 5 (sentyabr'-oktyabr'). C. 70-77.
18. Stepanenko, B.N. Khimiya i biokhimiya uglevodorodov (monosakharidy) / B.N. Stepanenko. M.: Vyssh. shk., 1977. C. 61-72.
19. Tekhnologicheskii priem obrabotki semyan kul'turnykh rastenii udarnym davleniem / Fomichenko V.V., Golovanchikov A.B., Lysak V.I., Nefed'eva E.E., Shaikhiev I.G. // Vestnik Kazanskogo tekhnologicheskogo universiteta. 2013. № 18. C. 188-190.
20. Khryanin V.N. Deistvie impul'snogo davleniya na sodержanie fitogormonov, protsessy rosta i razvitiya grechikhi / V.N. Khryanin, E.E. Nefed'eva, N.G. Mazei // Vestnik Nizhegorodskogo universiteta im. N.I. Lobachevskogo. Seriya: Biologiya. - 2001. S. 102-106.

УДК 581.1:631.531.027.3:631.559:581.143

Влияние обработки ИД на содержание протеина и некоторых сахаров в семенах пшеницы

¹ В.А. Павлова

² Е.В. Васичкина

³ С.Л. Белопухов

⁴ А.А. Колотвин

⁵ В.И. Лысак

¹ Волгоградский государственный технический университет, Россия

Аспирант

400005, Волгоград, пр. им. Ленина, 28

E-mail: Violetta_Mir@mail.ru

² Волгоградский государственный технический университет, Россия

Аспирант

400005, Волгоград, пр. им. Ленина, 28

E-mail: vasichkinaev@yandex.ru

³ Российский государственный аграрный университет - Московская Сельскохозяйственная Академия им. К.А. Тимирязева, Россия

Профессор, д.с.-х.н.

127550, Москва, ул. Тимирязевская, 49

E-mail: beloruhov@mail.ru.

⁴ Самарский государственный университет, Россия

Научный сотрудник

443011, г. Самара, ул. Ак. Павлова, 1

E-mail: kolotvin_alex@rambler.ru

⁵ Волгоградский государственный технический университет, Россия

Член-корреспондент РАН, профессор, доктор технических наук

400005, Волгоград, пр. им. Ленина, 28

E-mail: lysak@vstu.ru

Аннотация. Семена пшеницы твердой (*Triticum durum*) обрабатывали импульсным давлением (ИД), создаваемым ударной волной. Содержание протеина определяли методом БИК-спектроскопии. Содержание глюкозы определяли методом ВЭЖХ. Влажность семян в контроле составляла 14,2%, не изменилась при ИД 11 МПа и снизилась при ИД 29 МПа (12,8%), что указывало на повреждение семян. Содержание протеина в контрольном образце составляло 16,5%. При ИД 11 МПа содержание протеина осталось неизменным (16,9%), а при ИД 29 МПа возросло (17,2%) в связи с ускорением распада крахмала и относительным повышением содержания протеина. Содержание глюкозы в семенах при ИД 11 МПа было ниже контрольного, что могло быть связано с ускорением амино-карбонильной реакции. ИД 29 МПа привело к повышению содержания глюкозы, вероятно, из-за активизации неферментативного гидролиза крахмала. Таким образом, ИД 11 МПа оставило слабые повреждения без накопления глюкозы, ИД 29 МПа способствовало ускорению старения за счет накопления глюкозы.

Ключевые слова: импульсное давление; содержание белка; содержание глюкозы; гидролиз крахмала.