



антиоксидантной защиты при экспериментальном сахарном диабете. Адаптогенные средства растительного (тонизид) и гормонального (мелаксен) происхождения обладают антиоксидантными свойствами. На аллоксановой модели сахарного диабета они обнаруживают способность повышать активность ферментов антиоксидантной системы защиты клеток, регулировать свободно-радикальные процессы в организме. Применение тонизида может оказаться более эффективным по сравнению с мелаксеном, поскольку он оказывает прямое стимулирующее влияние на антиоксидантные ферментные системы организма, в частности на активность СОД [11, 12].

Список литературы

1. Арушанян Э. Б. Лечебные возможности препаратов корня женьшеня при сахарном диабете // Экспериментальная и клиническая фармакол. 2009. № 6. С. 52–56.
2. Анисимов В. Н., Арутюнян А. В., Хавинсон В. Х. Влияние мелатонина и эпиталамина на активность системы антиоксидантной системы у крыс // Доклады РАН. 1997. Т. 352. С. 831–833.
3. Анисимов В. Н., Арутюнян А. В., Хавинсон В. Х. Мелатонин и эпиталамин угнетают процесс перекисного окисления липидов у крыс // Доклады РАН. 1996. Т. 348. С. 765–767.
4. Королюк М. А., Иванова Л. И., Майорова И. Г. Токарев В. Е. Метод определения активности каталазы // Лаб. дело. 1988. № 1. С. 16–19.
5. Методические рекомендации при применении активных добавок. Томск, 2007. 186 с.
6. Sawada M, Carlson J. C. Changes in superoxide radical and lipid peroxide formation in the brain, heart and liver during the lifetime of the rat // Mech. Ageing Dev. 1987. Vol. 41. P. 125–137.
7. Shigenaga M. K., Hogen T. M., Ames B. N. Oxidative damage and mitochondrial decay in aging // Proc. Natl. Acad. Sci. 1994. Vol. 91. P. 10771–10778.
8. Шестакова С. А., Степанов Р. П., Григоренко Г. А и др. Антиоксидантная защита и структурные изменения в головном мозге у крыс при экспериментальном сахарном диабете // Проблемы эндокринологии. 2006. Т. 52, № 5. С. 37–43.
9. Uchiyama M., Michara M. Determination of malonaldehyde Cursor in tissues buthiobarbituric acid test // Biochem. 1978. Vol 1. P. 271–278.
10. Reiter R. J. Antioxidants actions of melatonin // Adv. Pharmacol. 1997. Vol. 38. P. 103–117.
11. Чевари С., Чаба И., Секкей Й. Роль супероксиддисмутазы в окислительных процессах клетки и метод определения её в биологических материалах // Лаб. дело. 1985. № 11. С. 678–681.
12. Стальная И. Д. Метод определения диеновой конъюгации ненасыщенных жирных кислот // Современные методы в биохимии. М., 1997. С. 63–64.

УДК 579.84+577.114.083+577.115

ВЫДЕЛЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА ЛИПОПОЛИСАХАРИДА *HERBASPIRILLUM SEROPEDICAE* Z78

Н. С. Шишонкова¹, О. Н. Смолькина¹,
М. П. Чернышова¹, В. В. Игнатов^{1,2}

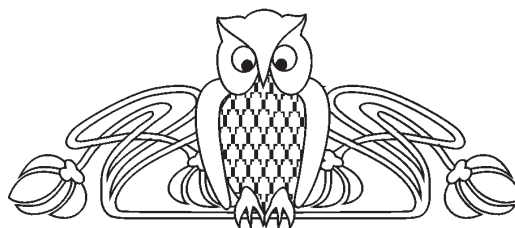
¹Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, Саратов

²Саратовский государственный университет

E-mail: room308@ibppm.sgu.ru

Из внешней мембраны бактерий *Herbaspirillum seropedicae* Z78 с использованием различных методов выделены препараты липополисахаридов (ЛПС). Ds-Na-электрофорез выявил их гетерогенную природу с преобладанием молекул R-формы. Анализ ЛПС показал присутствие характерных компонентов этих гликополимеров: углеводов, КДО и жирных кислот липида А. Среди основных компонентов гидрофобной части ЛПС идентифицированы 3-гидроксиундекановая, 2-гидрокси додекановая, 3-гидрокси додекановая, тетрадекановая, 2-гидрокси тетрадекановая и гексадекановая кислоты. Полисахаридная часть ЛПС содержала рамнозу, маннозу, глюкозу, галактозу, глюкозамин и гептозу – обязательную составляющую коровой области ЛПС, а также неидентифицированный моносахарид.

Ключевые слова: *Herbaspirillum seropedicae* Z78, липополисахариды.



Isolation and Characterization of *Herbaspirillum seropedicae* Z78 Lipopolysaccharide

N. S. Shishonkova, O. N. Smol'kina,
M. P. Chernyshova, V. V. Ignatov

Lipopolysaccharide (LPS) preparations were isolated from the outer membrane of the bacterium *Herbaspirillum seropedicae* Z78 by using various methods. SDS electrophoresis revealed that the samples were heterogeneous in nature and that R-form molecules were predominant. Analysis of the LPS showed the presence of components characteristic of these glycopolymers: carbohydrates, KDO, and lipid A fatty acids. The major components of the hydrophobic portion of the LPS were found to include 3-hydroxyundecanoic, 2-hydroxydodecanoic,



3-hydroxydodecanoic, tetradecanoic, 2-hydroxytetradecanoic, and hexadecanoic acids. The polysaccharide portion of the LPS contained rhamnose, mannose, glucose, galactose, glucosamine, and heptose, which is an essential component of the LPS core. It also contained an unidentified monosaccharide.

Key words: *Herbaspirillum seropedicae* Z78, lipopolysaccharides.

Бактерии рода *Herbaspirillum*, принадлежащие к β -субклассу *Proteobacteria*, являются эндофитными ассоциативными азотфиксаторами. Они были найдены в тканях важных сельскохозяйственных культур, таких как кукуруза, рис, сорго, пшеница и сахарная свекла [1]. Некоторые виды *Herbaspirillum* способны продуцировать фитогормоны, стимулирующие рост растений и защищающие их от патогенных микроорганизмов [1, 2]. Гербаспириллы были найдены во внутренних тканях корней растений, но в отличие от ризобий в условиях бобово-ризобияльного симбиоза гербаспириллы не способны вызывать развития клубеньков у колонизируемых ими растений [3, 4]. Ассоциация *Herbaspirillum* с растением-хозяином начинается с прикрепления бактерии к поверхности корня, затем идет этап колонизации корневой поверхности и проникновения в эпидермальную ткань [5], однако молекулярный механизм этого взаимодействия остается невыясненным. Важную роль в процессе растительно-микробной ассоциации могут играть липополисахариды (ЛПС) – одни из основных компонентов клеточной стенки грамотрицательных бактерий. Они представляют собой О-антигены бактериальной клетки, являются рецепторами для ряда специфических бактериофагов и бактериоцинов, играют ключевую роль в процессах межклеточного узнавания. ЛПС служат носителями биологической информации, которая закодирована в структурах сложных углеводов и распознается комплементарными участками на углеводсвязывающих белках (лектинах) [6–8]. В настоящее время в литературе известно только одно упоминание о составе ЛПС *H. seropedicae* [9]. Необходимо отметить, что авторы получали ЛПС с поверхности клеток, не отмытых от капсулы. Как известно, капсульные гликаны многих бактерий являются экстраклеточной формой ЛПС [10–12]. При экстракции О-антигена они также могут попадать в состав препарата и существенно влиять на результаты дальнейших исследований.

Цель настоящей работы – получение ЛПС из внешней мембраны *H. seropedicae* Z78 различными методами, а также сравнительный анализ выходов, макромолекулярной организации и состава выделенных препаратов.

Материалы и методы

В работе была использована бактериальная культура *Herbaspirillum seropedicae* Z78. Этот

штамм был впервые выделен из корней сорго и получен в коллекцию ИБФРМ РАН от J. Döbereiner из Бразилии. Бактериальную культуру выращивали на жидкой синтетической среде с малатом и глюкозой, содержащей витамины при 30°C до окончания экспоненциальной фазы роста.

После осаждения клеток центрифугированием с их поверхности удаляли капсулу 0.15 М NaCl в течение 5 сут с ежедневной заменой отмывающего раствора, как описано в работе [10] для бактерий рода *Azospirillum*. Далее отделенную биомассу трижды обрабатывали ацетоном, высушивали на воздухе и измельчали.

Для удаления с поверхности клеток фосфолипидов (обезжиривания) клетки обрабатывали дважды смесью метанол : хлороформ (1 : 2 V/V) и однократно смесью хлороформ : метанол : вода (3 : 2 : 0.25 V/V). Клетки осаждали центрифугированием и высушивали. Супернатант, содержащий фосфолипиды, отдували воздухом и анализировали.

Экстракт ЛПС получали добавлением буфера, содержащего этилендиаминтетрауксусную кислоту (ЭДТА), к отмытой от капсулы клеточной суспензии в фосфато-солевом буфере, pH 7.2. Клетки осаждали центрифугированием, а супернатант обрабатывали протеназой К.

Электрофорез экстрактов ЛПС выполняли в 12.5%-ном полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия (Ds-Na-ПААГ) [13]. Визуализацию компонентов осуществляли окрашиванием гелей красителем на основе азотно-кислого серебра после периодатного окисления [14].

Препараты ЛПС выделяли из высушенной, отмытой от капсулы бактериальной массы.

Для выделения ЛПС использовали метод, предложенный Галаносом [15], но с некоторыми модификациями. Биомассу дважды обрабатывали экстрагирующей смесью (90%-ный водный фенол-хлороформ-петролейный эфир) – РСР-экстракция. По методике Галаноса, при добавлении к полученному экстракту дистиллированной воды или кристаллического фенола ЛПС должен выпасть в осадок, однако этого не произошло. Оставшиеся после экстракции клетки суспендировали в дистиллированной воде при 68 °C в течение двух часов. Клетки осаждали центрифугированием. Процедуру проводили дважды. Супернатанты объединяли с экстрактом, полученным ранее, и диализовали с использованием мембран фирмы «Sigma» (предел исключения 10–14 кДа) против дистиллированной воды, концентрировали и лиофилизировали.

ЛПС также выделяли экстракцией по Вестфаль 45%-ным горячим водным фенолом [16]. Водные и фенольные части экстрактов после освобождения диализом от остатков фенола концентрировали и лиофилизировали.



Экстракцию полного антигена проводили также 2%-ной трихлоруксусной кислотой (ТХУ) по Буавену [17]. После осаждения клеток фракцию ЛПС диализовали, концентрировали и лиофилизировали.

Препараты ЛПС разделяли методом гель-фильтрации на колонке (45×1.8 см, $V_0 = 30$ мл) с носителем Sepharose CL-4B («Pharmacia», Швеция), в качестве элюирующего раствора использовали $0.025 \text{ M NH}_4\text{HCO}_3$ (рН 8.3). Детекцию продуктов разделения в элюатах выполняли с помощью дифференциального проточного рефрактометра LKB 2142 («LKB», Швеция). Все фракции, содержащие углеводы, которые не давали поглощения между 240 и 260 нм, объединяли, концентрировали и лиофилизировали.

Колориметрическое определение содержания в препаратах ЛПС углеводов, 2-кето-3-дезоксиктоновой кислоты (КДО), белков, нуклеиновых кислот (НК), фосфора проводили общепринятыми методами, описанными в работе [10]. Измерения выполняли на спектрофотометре Specord 40 («Analytik Jena AG», Германия).

Определение состава жирных кислот ЛПС в виде их метиловых эфиров (МЭЖК) осуществляли с помощью газожидкостной хроматографии (ГЖХ) на хроматографе GL-2010 («Shimadzu», Япония). Метилирование выполняли согласно методу, описанному в работе [18].

Состав моносахаридов исследовали методом ГЖХ в виде ацетатов полиололов [19]. Анализ образцов проводили на хроматографе Hewlett-Packard 5890 («Hewlett-Packard», США) с капиллярной колонкой HP5 в градиенте температуры от 180°C до 290°C со скоростью нагрева $10^\circ\text{C}/\text{мин}$.

Результаты всех экспериментов обрабатывали статистически. Данные представлены в виде средних значений (как минимум, трех экспериментов, каждый из которых проводился в трех повторностях) со средней квадратичной ошибкой. Доверительные интервалы определены для надежности 95%.

Результаты и их обсуждение

H. seropedicae Z78 выращивали на жидкой синтетической среде с малатом и глюкозой до окончания экспоненциальной фазы роста, которой она достигала к 18 часам. Клетки отделяли от культуральной жидкости и отмывали от капсулы 0.15 M NaCl в течение 5 сут с ежедневной заменой отмывающего раствора, как описано в работе [10] для бактерий рода *Azospirillum*.

При выборе методов выделения чаще всего руководствуются основными требованиями к получаемым препаратам: они должны выделяться с высоким выходом, не содержать примесей других

компонентов и находиться в недеградированной форме [20]. Известно, что ЛПС могут быть представлены S- и R-формами. Молекулы S-формы включают липид А, коровый олигосахарид и O-специфический полисахарид (ОПС), в то время как R-форма молекулы ЛПС лишена ОПС и включает только липид А и коровый олигосахарид. Каждой из этих форм в большей или меньшей степени присущи те или иные физико-химические свойства, что также играет важную роль при выборе метода для выделения ЛПС.

Для выявления макромолекулярной организации ЛПС *H. seropedicae* Z78 его выделяли быстрым методом с использованием в качестве одного из реагентов ЭДТА. Бактериальные клетки суспендировали в буферной смеси, содержащей ЭДТА. Экстракт ЛПС обрабатывали протеиназой К и исследовали методом Ds-Na-ПААГ-электрофореза с последующей визуализацией гликополимеров красителем на основе азотно-кислого серебра. Большая часть макромолекул была сосредоточена в нижней части электрофоретического трека, однако также была визуализирована одна узкая полоса в верхней части электрофореграммы. Эти данные говорят о значительном преобладании в пуле мембранного ЛПС молекул R-формы.

Одним из наиболее распространенных методов выделения R-ЛПС является метод Галаноса (РСР-экстракция) [15]. Однако при выделении ЛПС РСР-экстракцией из биомассы *H. seropedicae* Z78 его осаждения из экстракта не произошло. В связи с этим метод был модифицирован. Оставшиеся после экстракции клетки суспендировали в дистиллированной воде при 68°C в течение двух часов. Клетки осаждали центрифугированием. Процедуру повторили дважды. Отделенные от клеток опалесцирующие супернатанты объединяли с РСР-экстрактом, диализовали и концентрировали. Модифицированная РСР-экстракция привела к получению суммарного препарата ЛПС-РСР, выход которого составил 6.0% от массы сухих микробных клеток.

Учитывая, что электрофореграмма экстракта ЛПС ЭДТА содержала полосы, соответствующие молекулам S-формы, ЛПС выделяли по методу Вестфаль горячей водно-фенольной смесью (PW-экстракция) [16]. Этот метод широко применяется для получения S-ЛПС. ЛПС концентрировался как в водной, так и в фенольной частях экстракта, которые освобождали диализом от фенола. Полученные препараты были обозначены как ЛПС из водной части (ЛПС-PW_w) и ЛПС из фенольной части (ЛПС-PW_{ph}). После лиофилизации выходы ЛПС-PW_w и ЛПС-PW_{ph} составили 1.0 и 1.5% соответственно от массы сухих микробных клеток.



ЛПС также выделяли по методу Буавена (метод, используемый для извлечения полного О-антигена в комплексе с белком) [17]. После обработки клеток 2%-ным ТХУ был получен ЛПС-ТСА с выходом 1% от массы сухих микробных клеток.

Исследование биохимических составов, выделенных разными методами препаратов, показало, что они характеризовались наличием углеводов (~ 9 – 23%) и КДО (~ 2%), а также полным отсутствием НК (табл. 1).

Таблица 1

Биополимерный состав ЛПС бактерий *H. seropedicae* Z78, выделенных разными методами

Компоненты		ЛПС-PW _w	ЛПС-PW _{ph}	ЛПС-PCP	ЛПС-ТСА
Содержание, %	Углеводы	23.30 ± 1.36	18.70 ± 1.10	8.85 ± 0.20	12.75 ± 0.50
	Белок	1.46 ± 0.04	2.00	0.50 ± 0.16	1.4 ± 0.06
	НК	–	–	–	–
	Общий фосфор	0.80 ± 0.05	0.60	0.45 ± 0.12	0.46
	КДО	1.64 ± 0.02	1.92	1.96	1.92 ± 0.10
Выход ЛПС, % от веса сухих клеток		1.0	1.5	6.0	1.0

Примечание. «–» – содержание компонента не обнаружено.

В препаратах ЛПС-PW_w, ЛПС-PW_{ph} и ЛПС-ТСА было найдено до 2% белка. ЛПС-PCP отличался низким содержанием белка – 0.5%. Во всех препаратах обнаружено небольшое (менее 1%) содержание общего фосфора. Наличие фосфорилирования ЛПС, как известно, оказывает существенное влияние на субмолекулярную организацию этих гликанов в мембране.

Препараты полисахаридов всегда гетерогенны, что в первую очередь связано с присутствием молекул с разной длиной полисахаридной цепи. Метод гель-хроматографии позволяет разделить смесь веществ с различными молекулярными массами. Полученные препараты ЛПС подвергали гель-фильтрации на колонке с носителем Sepharose CL-4B. Было отмечено сильное сходство профилей элюции препаратов ЛПС-PW_w и ЛПС-ТСА, характеризовавшихся доминированием высокомолекулярной фракции, выходящей с нулевым объемом колонки. На профилях элюции ЛПС-PW_{ph} и ЛПС-PCP наблюдалась обратная картина – доминирование более низкомолекулярной фракции. Необходимо отметить, что содержание углеводов в полученных после лифилизации высокомолекулярных фракциях ЛПС-PW_w и ЛПС-PW_{ph} составило 53.4 и 23.5% соответственно. Однако выход этих препаратов был всего ~ 0.4% от веса сухой биомассы. Известно,

что ЛПС являются амфифильными молекулами, построенными из гидрофильной углеводной и гидрофобной липидной составляющих. Разница в содержании углеводов в ЛПС-PW_w и ЛПС-PW_{ph}, а также характер профилей элюции показывают, что PW-экстракция позволила разделить общий пул экстрагируемого ЛПС на две фракции, одна из которых (ЛПС-PW_w) содержала молекулы, проявляющие в большей степени гидрофильные, а другая (ЛПС-PW_{ph}) – гидрофобные свойства. Исходя из профилей элюции ЛПС-ТСА и ЛПС-PCP, а также данных о содержании углеводов в этих препаратах (см. табл. 1), можно сделать заключение о том, что ТСА-экстракция дает возможность выделить более высокомолекулярные фракции ЛПС, а модифицированный метод PCP-экстракции – более низкомолекулярные. Небольшое содержание углеводов в образцах ЛПС и очень низкий выход высокомолекулярной фракции наряду с результатами электрофореза указывают на преобладание в пуле мембранного ЛПС молекул R-формы.

Липиды – основные компоненты мембран, обеспечивающие структурно-функциональное соответствие клетки изменяющимся условиям среды обитания. ЛПС, наряду с фосфолипидами (ФЛ), формируют барьер проницаемости бактериальных клеток для различных химических веществ. Липид А – уникальный по структуре гликолипид, который в природе в свободном виде не существует и является компонентом только ЛПС. Своеобразие входящих в его состав жирных кислот (ЖК) используется как один из хемотаксономических критериев при выяснении филогенетических взаимосвязей между организмами [21, 22].

В составе всех исследуемых препаратов ЛПС методом ГЖХ в виде МЭЖК были найдены насыщенные, ненасыщенные и гидроксилкановые кислоты с длиной углеродной цепи от C₁₁ до C₁₈. В связи с тем что метод PW-экстракции позволил разделить весь пул мембранного ЛПС на гидрофобную и гидрофильную фракции, рассмотрим состав ЖК ЛПС-PW_w и ЛПС-PW_{ph} более подробно. Преобладающими в препаратах оказались 3-гидроксиундекановая (3-ОН-C11:0), 3-гидроксидодекановая (3-ОН-C12:0), тетрадекановая (C14:0), гексадекановая (C16:0) кислоты, а также октодеценная (C18:1) в ЛПС-PW_{ph} и 2-гидроксидодекановая (2-ОН-C12:0) в ЛПС-PW_w (табл. 2).

Известно, что гидроксикислоты представляют собой обязательную и, как правило, преобладающую составляющую липида А (на их долю приходится 50–75% от общего содержания кислот) [23]. Сумма гидроксикислот в ЛПС-PW_w и ЛПС-PW_{ph} составила 43.3 и 24.0% соответственно от содержания МЭЖК, обнаруженных хроматографически.



Таблица 2

Соотношение жирных кислот в препаратах ЛПС-PW_w, ЛПС-PW_{ph}, ФЛ, ЛПС-PW'_w и ЛПС-PW'_{ph} бактерий *H. seropedicae* Z78

Жирные кислоты	Содержание МЭЖК (в % от суммы площадей всех пиков)				
	ЛПС-PW _w	ЛПС-PW _{ph}	ФЛ	ЛПС-PW' _w	ЛПС-PW' _{ph}
3-гидроксиундекановая 3-ОН-C11:0	14.0	10.2	–	14.3	16.8
2-гидроксидодекановая 2-ОН-C12:0	9.1	сл.	–	11.8	11.3
3-гидроксидодекановая 3-ОН-C12:0	20.2	14.2	–	28.7	25.7
Тетрадекановая C14:0	28.0	16.4	–	27.0	28.1
Изопентановая i-C15:0	сл.	сл.	26.6	–	–
2-гидрокси-тетрадекановая 2-ОН- C14:0	сл.	сл.	–	8.3	8.6
Гексадекановая C16:0	14.8	26.5	31.0	6.7	9.5
Гексадеценовая C16:1	сл.	сл.	14.2	–	–
Октодеценовая C18:1	–	10.7	14.2	–	–
Нанодекановая C19:0	–	–	14.0	–	–
Σ гидроксикислот	43.3	24.0	–	63.1	62.4

Примечание. «сл.» – содержание компонентов не более 0.1%; «–» – ЖК отсутствовали.

Необходимо отметить, что ненасыщенные ЖК в составе липида А встречаются редко. Однако известно, что присутствие ненасыщенных ЖК снижает кристаллизацию мембран при низких температурах за счет изгибов в алифатических цепях, создаваемых двойными связями [24, 25]. Исследование состава ЖК ФЛ *H. seropedicae* Z78, полученных экстракцией с поверхности клеток смесью хлороформа и метанола методом ГЖХ показало, что эти макромолекулы построены из изопентановой (C15:0), C16:0, гексадеценовой (C16:1), C18:1 и нанодекановой (C19:0) кислот (см. табл. 2). В связи с этим присутствие в препарате ЛПС-PW_{ph} C18:1 и следовых количеств C16:1 и i-C15:0 можно объяснить наличием примеси ФЛ, которая, вероятно, попадает при выделении ЛПС в фенольную часть экстракта за счет своей гидрофобности.

Из обезжиренных клеток РW-экстракцией выделяли ЛПС-PW'_w и ЛПС-PW'_{ph}, как описано ранее. ГЖ хроматограммы полученных препаратов характеризовались практически полным отсутствием шума и наличием малых количеств кислот C16:1 и C18:1 (менее 1%). Было отмечено снижение содержания C16:0, а также увеличение – 2-ОН-C12:0 и 2-ОН-C14:0 кислот (табл. 2). Составы и соотношения ЖК ЛПС-PW'_w и ЛПС-

PW'_{ph} оказались одинаковыми. На основании этого можно сказать, что при РW-экстракции ЛПС из обезжиренных клеток не происходит деструкции липида А, а распределение макромолекул в водную и фенольную части экстракта связано с размерами их полисахаридной составляющей. Таким образом, показано, что в состав липида А ЛПС *H. seropedicae* Z78 входят 3-ОН-C11:0, 2-ОН-C12:0, 3-ОН-C12:0, C14:0, 2-ОН-C14:0 и C16:0 кислоты. Сумма же гидроксикислот в полученных после обезжиривания клеток образцах ЛПС составила ~ 63% (см. табл. 2), что согласуется с литературными данными о количестве оксикислот в липидах А [23].

Моносахаридный состав исследовали методом ГЖХ в виде ацетатов полиолов. Все образцы содержали рамнозу, маннозу, глюкозу, галактозу, глюкозамин и гептозу – обязательную составляющую коровой области ЛПС. Помимо этого был обнаружен неидентифицированный моносахарид.

Таким образом, из внешней мембраны бактерий *H. seropedicae* Z78, выращенных на среде с малатом и глюкозой, модифицированной РСР-экстракцией, РW-экстракцией и экстракцией по Буавену, получены препараты ЛПС-РСР, ЛПС-PW'_w, ЛПС-PW'_{ph} и ЛПС-ТСА с выходами 6.0, 1.0, 1.5, 1% соответственно от массы сухих



микробных клеток. Все препараты характеризовались наличием основных компонентов ЛПС: углеводов, КДО и жирных кислот липида А. Показано, что внешняя мембрана *H. seropedicae* Z78 построена из S- и R-ЛПС. Продемонстрировано, что РW-экстракция позволила разделить общий пул экстрагируемого ЛПС на две фракции, одна из которых (ЛПС-РW_w) содержала молекулы, проявляющие в большей степени гидрофильные, а другая (ЛПС-РW_{ph}) – гидрофобные свойства. Такое распределение вызвано различием в размере углеводных составляющих ЛПС-РW_w и ЛПС-РW_{ph}. Также было показано, что метод Буавена дает возможность выделить более высокомолекулярные, а модифицированный метод РСР-экстракции – более низкомолекулярные фракции ЛПС. Отмечено, что на высокомолекулярную фракцию ЛПС (с содержанием углеводов ~ 50%) приходилось около 0.4% от массы сухих клеток, что наряду с результатами Ds-Na-ПААГ-электрофореза свидетельствует о преобладании в пуле мембранного ЛПС молекул R-формы. Выявлено, что липид А ЛПС *H. seropedicae* Z78 построен из 3-гидроксиундекановой, 2-гидроксидодекановой, 3-гидроксидодекановой, тетрадекановой, 2-гидрокситетрадекановой и гексадекановой кислот, а полисахаридная часть ЛПС представлена рамнозой, маннозой, глюкозой, галактозой, глюкозамином и гептозой, а также одним неидентифицированным сахаром.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке РФФИ (11-04-00533-а).

Список литературы

1. Baldani J. I., Baldani V. L. D., Seldin L., Dobereiner J. Characterization of *Herbaspirillum seropedicae* gen. nov. sp. nov.: a root-associated nitrogen-fixing bacterium // Intern. J. Syst. Bacteriol. 1986. Vol. 36. P. 86–93.
2. Baldani J. I., Baldani V. L. D. History of biological nitrogen-fixation research in graminaceous plants: special emphasis on the Brazilian experience // Ann. Brasil Acad. Sci. 2005. Vol. 77, iss. 3. P. 547–579.
3. James E. K., Olivares F. L. Infection and colonization of sugar cane and other graminaceous plants by endophytic diazotrophs // Crit. Rev. Plant Sci. 1998. Vol. 17, iss. 1. P. 77–119.
4. Roncato-Maccari L.D.B., Ramos H.J.O., Pedrosa F.O., Alquini Y., Chubatsu L.S., Yates M.G., Rigo L.U., Steffens M.B.R., Souza E.M. Endophytic *Herbaspirillum seropedicae* express nif genes in gramineous plants // FEMS Microbiol. Ecol. 2003. Vol. 45, iss. 1. P. 39–47.
5. Elbeltagy A., Nishioka K., Sato T., Suzuki H., Ye B., Hamada T., Isawa T., Mitsui H., Minamisawa K. Endophytic colonization and in planta nitrogen fixation by a *Herbaspirillum* sp. isolated from wild rice species // Appl. Environ. Microbiol. 2001. Vol. 67, iss. 11. P. 5285–5493.
6. Luderitz O., Freudenberg M., Galanos C., Zehman K., Rietschel E., Shaw D.H. Lipopolysaccharide of gram-negative bacteria // Curr. Top. Membr. Transport. 1982. Vol. 17. P. 79–134.
7. Vaara M. Antibiotic-supersusceptible mutants of *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* // Antimicrob. Agents. Chemother. 1993. Vol. 37. P. 2255–2260.
8. Nikaido H., Vaara M. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability // Microbiol. Rev. 1985. Vol. 49. P. 1–32.
9. Serrato R. V., Sasaki G. L., Cruz L. M., Carlson R. W., Muszynski A., Monteiro R. A., Pedrosa F. O., Iacomini M. Chemical composition of lipopolysaccharides isolated from various endophytic nitrogen-fixing bacteria of the genus *Herbaspirillum* // Can. J. Microbiol. 2010. Vol. 56, iss. 4. P. 342–347.
10. Konnova S. A., Makarov O. E., Skvortsov I. M., Ignatov V. V. Isolation, fractionation and some properties of polysaccharides produced in a bound form by *Azospirillum brasilense* and their possible involvement in *Azospirillum* – wheat root interaction // FEMS Microbiol. Lett. 1994. Vol. 118, № 2. P. 93–99.
11. Whitfield C., Roberts I.S. Structure, assembly and regulation of expression of capsules in *Escherichia coli* // Mol. Microbiol. 1999. Vol. 31, iss. 5. P. 1307–1319.
12. Смолькина О. Н., Качала В. В., Федоненко Ю. П., Бурьгин Г. Л., Здоровенко Э. Л., Матора Л. Ю., Коннова С. А., Игнатов В. В. Капсульный полисахарид бактерий *Azospirillum lipoferum* Sp59b: структура, антигенная специфичность // Биохимия. 2010. Т. 75, вып. 5. С. 707–716.
13. Hitchcock P. J., Brown T. M. Morphological heterogeneity among *Salmonella* lipopolysaccharide chemotypes in silver-stain polyacrylamide gels // J. Bacteriol. 1983. Vol. 154. P. 269–277.
14. Tsai C. M., Frasch C. E. A sensitive silver stain for detecting lipopolysaccharides in polyacrylamide gels // Anal. Biochem. 1982. Vol. 119. P. 115–119.
15. Galanos C., Lubertiz O., Westohal O. A new method for the extraction of R lipopolysaccharides // Eur. J. Biochem. 1969. Vol. 9, № 2. P. 245–249.
16. Вестфаль О., Янн К. Бактериальные липополисахариды. Методы химии углеводов. М., 1967. С. 325–332.
17. Boivin A., Mesrobian L. Extraction d'un complexe toxique et antique a partir du bacilli d'aertycke // Compt. Rend. Soc. Boil. 1933. Vol. 114, № 30. P. 307–310.
18. Hakomori S.-I. A rapid permetylation of glycolipids and polysaccharides catalyzed by methylsulfinyl carbanion in dimethylsulfoxide // J. Biochem. 1964. Vol. 55. P. 205–208.
19. Sawardeker J. S., Sloneker J. H., Jeanes A. Quantitative determination of monosaccharides as their alditol acetates by gas liquid chromatography // Anal. Chem. 1965. Vol. 37. P. 1602–1603.
20. Захарова И. Я., Косенко Л. В. Методы изучения микробных полисахаридов. Киев, 1982. 192 с.
21. Stead D.E. Grouping of plant-pathogenic and some other *Pseudomonas* spp. by using cellular fatty acid profiles // Intern. J. Syst. Bacteriol. 1992. Vol. 42, № 2. P. 281–295.



22. Heike R.U.S., Freudenberg M., Weckesser J., Mayer H. Lipopolysaccharide of *Rhodospirillum salinarum* 40: structural studies on the core and lipid A region // Arch. Microbiol. 1995. Vol. 164. P. 280–289.
23. Красикова И. Н., Соловьева Т. Ф., Оводов Ю. С. Структура и свойства липида А – компонента эндотоксинов

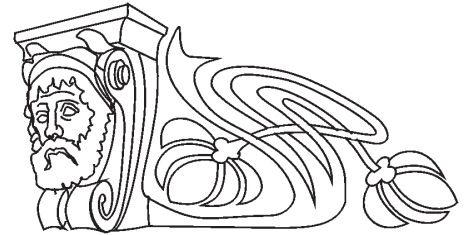
- грамотрицательных бактерий // Химия природных соединений. 1989. № 5. С. 601–616.
24. Казава Я. Биомембраны. М., 1985. 303 с.
25. Wiese A., Seydel U. Interaction of peptides and proteins with bacterial surface glycolipids: a comparison of glycosphingolipids and lipopolysaccharides // J. Ind. Microbiol. Biotech. 1999. Vol. 23. P. 414–424.

УДК 612.14

АНАЛИЗ ДИНАМИКИ ПОЧЕЧНОГО КРОВОТОКА С ПРИМЕНЕНИЕМ ВЕЙВЛЕТОВ

А. Н. Павлов, О. В. Семьякина-Глушковская, О. Н. Павлова, И. А. Семьякин-Глушковский, С. С. Синдеев, О. А. Бибикина

Саратовский государственный университет
E-mail: pavlov_lesha@mail.ru



Исследуются характерные особенности авторегуляции почечного кровотока для нормотензивных и спонтанных гипертензивных крыс с использованием дискретного вейвлет-преобразования. Показано, что вариабельность вейвлет-коэффициентов может служить в качестве чувствительной меры патологических изменений в динамике почки. Пониженные значения вариабельности отражают менее выраженные адаптационные возможности сосудистой системы при почечной гипертензии.

Ключевые слова: почечная регуляция, динамика сосудов, вейвлет-анализ.

Analysis of Renal Blood Flow Dynamics Using Wavelets

A. N. Pavlov, O. V. Semyachkina-Glushkovskaya, O. N. Pavlova, I. A. Semyachkin-Glushkovsky, S. S. Sindeev, O. A. Bibikova

We study characteristic features of renal blood flow autoregulation in normotensive and spontaneous hypertensive rats using the discrete wavelet transform. We show that the variability of wavelet-coefficients can serve as an essential measure of pathological changes in renal dynamics. The reduced variability reflects a smaller flexibility of the vascular system in the hypertension state.

Key words: renal regulation, vascular dynamics, wavelet-analysis.

К числу важнейших достижений в области renal физиологии, совершенных за последние годы, относится открытие автоколебательной динамики структурных элементов почки – нефронов [1, 2]. Существование ритмических процессов в функционировании нефронов вызывает значительный интерес специалистов, занимающихся изучением проблемы генеза почечной гипертензии, так как новые экспериментальные факты позволили установить ряд принципиальных отличий в регуляции почечного кровотока для случаев нормы и данной формы патологии. В их числе следует отметить изменения механизмов канальцево-гломерулярной обратной связи и миогенного отклика

гладких мышц стенок сосудов, приводящие к хаотизации скорости микроциркуляции крови в артериолах, а также ослабление эффектов взаимодействия соседних нефронов [3–6]. В частности, было обнаружено, что незатухающие колебания, идентифицируемые в канальцах нефронов, являются близкими к периодическим в норме и сильно нерегулярными (хаотическими) при почечной гипертензии [7]. Более того, эффект усложнения динамики наблюдается при разных формах гипертензии (крысы с генетической формой гипертензии, крысы с гипертензией Голдблетта и т. д.) [8]. Таким образом, усложнение динамики индивидуальных нефронов является ключевым маркером патологических изменений в функционировании почки и соответствующие изменения находят отражение при переходе от уровня микроциркуляции крови (где они более четко выражены) к макроуровню всей почки [9].

Целью данного исследования явилось изучение возможности диагностики характерных особенностей почечной регуляции кровотока с помощью дискретного вейвлет-преобразования, являющегося одним из наиболее эффективных инструментов исследования структуры физиологических процессов [10, 11]. В частности, ранее проводившиеся исследования продемонстрировали значительный потенциал данного подхода для диагностики сердечно-сосудистых патологий [12, 13].

Материалы и методы

Эксперименты проводились в институте Панум (университет Копенгагена, Дания) с помощью метода лазерной доплеровской флуометрии (ЛДФ) [8]. Регистрация скорости потока крови в приносящих артериолах корковых нефронов осуществ-