

8. Baltrusaityte V., Venskutonis P.R., Ceksteryte V. Antibacterial Activity of Honey and Beebread. *Food Technol. Biotechnol.*, 2007, vol. 45, no. 2, pp. 201-208.
9. Abdullah F., Abdulaziz M.A. The prophylactic and curative effect of cedar honey induced ulcers in rabbits. *The Sec. Int. Arab Api. Conf. Amman*, 1998, vol. 1, pp. 26-31.
10. Meda A., Lamien C.E., Romito M., Millogo J., Nacoulma O.G. Determination of the total phenolic, flavonoid and proline contents in Burkina Fasan honey, as well as their radical scavenging activity. *Food Chem.*, 2005, vol. 91, pp. 571-577.

СОРБЦИЯ ЛИПОПОЛИСАХАРИДОВ ЦЕОЛИТАМИ МОДИФИЦИРОВАННЫМИ ХИТОЗАНОМ

Горбач В.И.¹, Давыдова В.Н.¹, Володько А.В.¹, Шапкин Н.П.², Ермак И.М.¹

¹ Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова, ДВО РАН
пр. 100-летия Владивостока, 159, г. Владивосток, 690022, РФ
e-mail: vikdavidova@yandex.ru

² Дальневосточный Федеральный университет
Кампус ДВФУ, о. Русский, Владивосток, 690922, РФ

Аннотация. На основе природного цеолита получены сорбенты модифицированные хитозаном и хитозаном с последующим добавлением соли меди. Определены размеры и поверхностные потенциалы хитозана и эндотоксинов грамотрицательных бактерий (ЛПС) в растворе. Рассчитана константа связывания липополисахаридов с хитозаном, свидетельствующая о высокой аффинности взаимодействия. Найдено, что композиты цеолит + хитозан и особенно цеолит + хитозан + соль меди связывают из раствора от 60 до 99 % эндотоксина. Эти результаты подтверждены данными ЛАЛ-теста. Показано, что колонки с предлагаемыми сорбентами могут быть использованы для препаративного получения апиrogenных растворов.

Ключевые слова: хитозан, цеолиты, липополисахарид, сорбция эндотоксина.

SORPTION OF LIPOPOLYSACCHARIDES BY CHITOSAN MODIFIED ZEOLITES

Gorbach V.I.¹, Davydova V.N.¹, Volodko A.V.¹, Shapkin N.P.², Ermak I.M.¹

¹Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, FEB RAS
100-letuya Vladivostoka av., 159, Vladivostok, 690022, Russia
e-mail: vikdavidova@yandex.ru

²Far East Federal University
Campus FEFU, isl. Russkiy, Vladivostok, 690922, Russia

Annotation. Sorbents on the basis of natural zeolite modified with chitosan and chitosan with following addition of copper salts chitosan were prepared. The sizes and surface potentials of chitosan and endotoxins (LPS) of gram-negative bacteria were determined in solution. Calculated binding constant of lipopolysaccharide to chitosan indicated a high affinity of their interaction. It was found the zeolite-chitosan composite and especially zeolite-chitosan-copper composite in solution bind from 60 to 99 % of endotoxin. These results were confirmed by LAL assay. It is shown that column with the proposed sorbents can be used for preparative producing of pyrogen-free solutions.

Keywords: chitosan, zeolites, lipopolysaccharide, sorption of endotoxin.

Эндотоксины (липополисахариды, ЛПС) являются важным фактором патогенности грамотрицательных бактерий. При попадании бактерий в макроорганизм эндотоксины высвобождаются из клеток, вызывая целый ряд негативных физиологических эффектов, приводящих в ряде случаев к сепсису и летальному исходу.

Эндотоксины циркулируют не только в макроорганизме, но и присутствуют в различных жидкостях, что создает большие трудности для получения медицинских препаратов. В отличие от бактерий, эндотоксин не может быть удален стандартными методами, такими как автоклавирование или фильтрация. В связи с этим разрабатываются различные приемы удаления бактериальных эндотоксинов, основанные на специфическом связывании ЛПС с различными соединениями. Для сорбции ЛПС наиболее перспективными представляются вещества катионной природы, способные связывать эндотоксины с высокой аффинностью. К таким веществам относится хитозан – β-1,4-глюкозаминогликан – полностью или частично N-деацетилированное производное хитина. Ранее нами была показана высокая специфичность связывания эндотоксинов грам-отрицательных бактерий в растворах с хитозаном с константой связывания 10^5 - 10^6 M⁻¹ [1]. В связи с этим весьма перспективным представляется разработка на основе хитозана высокоэффективных сорбентов для очистки биологических жидкостей от эндотоксинов.

Цеолиты - большая группа близких по составу и свойствам природных минералов, представляющих собой кристаллические гидратированные алюмосиликаты щелочных и щелочноземельных металлов. Цеолиты нетоксичны, не канцерогенны и используются в различных областях промышленности, безопасны для использования в медицинских устройствах: Цеолит легко добываемый и недорогостоящий материал.

Цеолит из Чугуевского района Приморского края (Россия) был смешан с раствором хитозана и подщелочен аммиаком. Далее он был смешан с раствором сульфата меди, промыт водой и снова смешан с раствором феррицианида калия. После промывки и высушивания он содержал около 3 % хитозана и 2.8 % меди

[2]. Нами изучено удаление эндотоксинов грамотрицательных бактерий из растворов с использованием полученных сорбентов.

Известно, что для взаимодействия биополимеров, особенно разнозаряженных, большое значение имеют их строение, молекулярная масса (М.М), конформация и степень агрегации молекул в растворе, поэтому большое внимание было уделено характеристике структуры и поведения в растворе изучаемых полисахаридов.

Молекулярная масса образца хитозана была определена вискозиметрическим методом и составила 200 кДа. На основании анализа спектра ¹H-ЯМР была рассчитана степень N-ацетилирования (СА) образца хитозана составившая 8 %.

Молекулярную массу липополисахаридов определяли методом ГЖХ после гидролиза и получения ацетатов полиолов и считали как 6200, 8500, 24000 Да для ЛПС *Y. Pseudotuberculosis*, *Y. enterocolitica*, *E. Coli*, соответственно.

Флуоресцентно-меченные производные ЛПС (Ф-ЛПС) получали реакцией между флуоресцеинизотиоцианатом (ФИТЦ) и ЛПС *E. coli* и *Y. Pseudotuberculosis*. Методику синтеза проводили и количество ФИТЦ-групп, связанных с ЛПС, определяли используя коэффициент экстинкции ФИТЦ 85000 моль⁻¹*см⁻¹ [3], оно равно 0,88 и 0,09 моль/моль ЛПС, соответственно.

Известно, что амфифильные биополимеры в растворе существуют в виде агрегатов, образующих частицы определенного размера и обладающих зарядом (ζ-потенциал). Размеры и ζ-потенциалы хитозана и ЛПС в растворе определяли с помощью Zetasizer Nano ZS (Malvern, Великобритания) работающего на длине волны 633 нм. Измерения проводились при температуре 25 °С. (см. табл. 1).

ЛПС из 3 типов бактерий при 25 °С представляют собой гетерогенные по размерам отрицательно заряженные частицы. Повышение температуры до 37 °С сопровождается уменьшением размеров агрегатов ЛПС *Y. enterocolitica* и *Y. pseudotuberculosis*. ЛПС *E. coli* при повышении температуры становится гомогенным и образует агрегаты, размером около 100 нм. Заряд частиц ЛПС варьирует от -36.5 до -26.0 мВ. Использованный хитозан, образует заряженные частицы, с относительно невысоким положительным зарядом (+14.9 мВ).

Таблица 1 – Характеристика ЛПС и хитозана методом динамического светорассеяния

Образец	n*	Размер частиц, нм (содержание,%)		ζ-потенциал, мВ
		25°С	37°С	
Хитозан 200 кДа, СА – 8 %				+14.9±1.4
ЛПС <i>E. coli</i>	25.0	52.5±1,1 (96 %) 2180±15 (4 %)	98.3±8.8	-36.5±1.3
ЛПС <i>Y. entero- colitica</i>	5.0	46.6±2.4 (56 %) 254.2±17 (44 %)	33.6±1 (72 %) 106.1±4.5 (28 %)	-29.4±2.3
ЛПС <i>Y. pseudo- tuberculosis</i>	2.4	138.3±13 (44 %) 582.5±91 (56 %)	105.8±13 (31 %) 492.7±31 (69 %)	-26.0±0.9

n*-средняя степень полимеризации O-специфических цепей ЛПС

Ранее нами было показано, что образец хитозана с молекулярной массой 110 кДа, содержащий 1 % ацетатных групп имеет заряд равный +36.1 мВ [4]. Такая разница связана с вкладом ацетильных групп, замещающих часть свободных аминогрупп в поликатионе, а также, возможно, различной конформацией макромолекул полимера.

Наши предыдущие исследования показали, что взаимодействие между аминогруппами хитозана, с одной стороны, и карбоксильными и фосфатными группами ЛПС являются определяющими при формировании комплексов эндотоксин-поликатион [5]. В данном случае цеолиты были модифицированы хитозаном, имеющим более высокую степень ацетилирования и более низкое значение поверхностного потенциала (см. табл. 1). Для оценки эффективности взаимодействия ЛПС с данным образцом хитозана были определены константы их связывания.

Константы связывания ЛПС с хитозаном были определены при замещении анионного красителя тропеолин 000 N2 из его комплекса с хитозаном. Метод был описан ранее [5] для определения параметров связывания различных ЛПС с хитозаном с ММ 130 кДа и СА 4 %. В настоящем исследовании был использован хитозан с ММ 200 кДа и СА 8 %. Мы определили константу связывания этого хитозана с ЛПС *E. coli* и *Y. Pseudoberculosis*.

При взаимодействии обоих ЛПС с комплексом тропеолин-хитозан были получены кривые насыщения (Ленгмюра), которые при преобразовании в координаты Скетчарда $\Delta D / (\Delta D / C_{\text{ЛПС}})$ дают прямые линии говорящие об отсутствии кооперативности взаимодействия и позволяющие определить константу связывания комплекса ЛПС-хитозан (см. табл. 2)

Константа связывания для хитозана использованного при получении сорбента (ММ 200 кДа, СА 8 % равна для ЛПС *E.coli* и ЛПС *Y.pseudotuberculosis* 5.46 ± 0.71 и $1.40 \pm 0.43 \cdot 10^5$, M^{-1} соответственно. Те же константы для исследованного ранее хитозана с ММ 130 кДа и СА 4 % равны 7.95 и $0.61 \cdot 10^5$, M^{-1} соответственно [6]

Таблица 2 – Константы связывания ЛПС с хитозанами с различными ММ и СА

ЛПС	$K_{\text{св}} \times 10^5, M^{-1}$ Для хитозана с ММ 200 кДа и СА 8%	$K_{\text{св}} \times 10^5, M^{-1}$ Для хитозана с ММ 130 кДа и СА 4% [6]
<i>E. coli</i> O55	5.46 ± 0.71	7.95
<i>Y. pseudotuberculosis</i> 1B	1.40 ± 0.43	0.61

Как видно из таблицы 2, увеличение СА хитозана и снижение его поверхностного потенциала не оказывает значительного влияния на аффинность связывания с ЛПС *E. coli* и увеличивается в случае ЛПС *Y. pseudotuberculosis*, что видимо связано с увеличением содержания гидрофобных групп в молекуле хитозана.

Для быстрого скрининга сорбционной активности широкого набора сорбентов была использована реакция на ЛПС с красителем диметилметиленовым голубым (голубой Тейлора). Были исследованы различные сорбенты: цеолиты, вермикулиты, глины модифицированные хитозаном; цеолиты, модифицированные хитозаном и обработанных феррицианидами металлов; Наиболее эффективными для связывания эндотоксинов показали себя сорбенты, полученные на основе цеолита (Ц) модифицированного хитозаном (Ц+Х) и цеолита модифицированного хитозаном и дополнительно обработанного солью меди (Ц+Х+М). Эти сорбенты были выбраны для дальнейшего исследования.

Вначале сорбционные свойства цеолитов проводили с использованием растворов ЛПС *Yersinia enterocolitica* и *Escherichia coli*. К 500 мкл растворов липополисахаридов (1000 мкг/мл) *Y. enterocolitica* и *E. coli* добавляли различные количества сорбентов и инкубировали 15 мин при 37 °С, центрифуговали и супернатант анализировали на содержание ЛПС методом ВЭЖХ на приборе Agilent 1100 с рефрактометрическим детектором, на колонке Shodex Asahipak GS-620. % сорбции рассчитывали по формуле:

$$\% \text{ сорб.} = \frac{C \text{ исходного р-ра ЛПС} - C \text{ супернатанта после сорбции}}{C \text{ исх. р-ра}} \cdot 100.$$

Все измерения проводили в трех параллелях, результаты приведены в таблице 3.

Таблица 3 – % сорбции *Y. enterocolitica* and *E. coli* ЛПС модифицированными цеолитами согласно данным ВЭЖХ анализа за 15 мин. при 37 °С

Количество сорбента, мг	ЛПС связывание, %			
	Цеолит + хитозан		Цеолит + хитозан + соль меди	
	<i>Y. enterocolitica</i>	<i>E. coli</i>	<i>Y. enterocolitica</i>	<i>E. coli</i>
50	67.10 ± 3.41	44.51 ± 2.67	26.37 ± 4.86	40.23 ± 2.17
100	86.25 ± 1.75	49.49 ± 5.20	51.88 ± 4.75	45.21 ± 2.21
150	91.80 ± 0.78	68.29 ± 1.33	77.68 ± 2.35	61.97 ± 3.22
200	91.51 ± 1.27	78.75 ± 2.08	83.19 ± 2.99	75.93 ± 4.92
250	91.08 ± 0.43	82.15 ± 1.43	96.69 ± 0.21	79.44 ± 3.99
300	91.34 ± 0.39	88.09 ± 2.06	97.17 ± 0.55	88.82 ± 4.10
400	91.30 ± 0.26	97.51 ± 4.01	96.99 ± 0.52	91.60 ± 0.45

Как видно из таблицы количество сорбированного эндотоксина возрастает от 40 до более чем 90 % при увеличении количества модифицированного цеолита.

Конечно, в реальных условиях такие большие количества ЛПС в растворах и биологических жидкостях вряд ли будут присутствовать. Поэтому изучать процесс сорбции желательнее для более разбавленных растворов эндотоксина. Для повышения чувствительности были получены флуоресцентно-меченные производные ЛПС. В качестве флуоресцентной метки был использован флуоресцеинизоцианат. Использование Ф-ЛПС позволило определять концентрацию эндотоксина в растворе до 0,25 мкг/мл. В последующих экспериментах использовали исходные растворы эндотоксинов с концентрацией 25 мкг/мл. К 20 мг сорбента смоченного Na-фосфатным буфером (0,01 М, pH 7,0) добавляли 300 мкл раствора эндотоксина (25 мкг/мл) смесь встряхивали и оставляли на 24 часа при температуре 25 °С или 37 °С, суспензию центрифугировали и измеряли флуоресценцию супернатанта. % сорбции рассчитывали по формуле:

$$\% \text{ сорб.} = \Phi \text{ исходного р-ра ЛПС} - \Phi \text{ супернатанта после сорбции} / \Phi \text{ исх.р-ра} * 100.$$

Все измерения проводились в трех параллелях, результаты приведены в таблице 4.

Как видно из таблицы 4, сорбция для обоих ЛПС возрастала по мере усложнения структуры сорбента и слабо зависела от структуры ЛПС и температуры. Для сорбента Ц+Х+М она при 37 °С превышала 99 %. Столь высокой результат можно объяснить уменьшением концентрации эндотоксина в растворе что приводит к изменению его агрегационного состояния, уменьшению гетерогенности по размерам частиц (см. табл. 1), хотя возможно и влияние на этот процесс введения флуорометки в молекулу.

Таблица 4 – % сорбции Ф-ЛПС *E. Coli* и *Y. Pseudotuberculosis* цеолитами за 24 часа при 25 °С или 37 °С

Сорбент	Ф-ЛПС связывание, %			
	ЛПС <i>E. coli</i> .		ЛПС <i>Y. pseudotuberculosis</i>	
	25 °С	37 °С	25 °С	37 °С
Цеолит	37.70±2.99	24.48±2.83	52.91±2.76	45.75±3.82
Цеолит+Хит.	67.44±5.76	66.63±5.24	63.21±2.62	58.41±7.93
Цеол.+Хит.+Cu	95.23±1.82	99,27±1.78	98.57±5.58	99.23±0.97

Для практического использования полученных результатов нами был использован колоночный вариант сорбции эндотоксинов цеолитами. Для этого в колонку диаметром 0,6 см помещали 50 мг сорбента, промывали Na-фосфатным буфером (0,01 М, рН 7,0), наносили 300 мкл раствора Ф-ЛПС *E. coli* с концентрацией 50 мкг/мл и хроматографировали при атмосферном давлении (приблизительно 20-30 мин.). Собранный элюат анализировали на содержание Ф-ЛПС. Сорбционную эффективность колонки оценивали как описано выше, результаты приведены в таблице 5.

Таблица 5 – % сорбции *E. coli* Ф-ЛПС цеолитами в колоночном варианте

Сорбент	% сорбции
Цеолит	74,32
Цеолит+хитозан	85,06
Цеол.+Хит+Cu	99,32

Как видно из таблицы сорбционная активность сорбентов по отношению к эндотоксину очень напоминает результаты полученные в статичном варианте, хотя для Ц и Ц+Х выше, а для Ц+Х+М достигает 99,32 % даже при температуре 25 °С.

Для определения содержания эндотоксинов в фармацевтических препаратах, для контроля качества воды и т.д. широко используется ЛАЛ тест, определяющий нанограмовые количества ЛПС. Для определения способности цеолитов очищать водные растворы содержащие очень низкие количества эндотоксина к сорбенту (20 мг) добавляли 300 мкл раствора ЛПС *E. coli* в концентрации 50 нг/мл. После инкубации за 30 мин. при 37 °С содержание эндотоксина в супернатанте определяли с использованием хромогенного ЛАЛ-теста (Pierce® LAL Chromogenic Endotoxin Quantitation Kit «Thermo Scientific»). Результаты, представленные в таблице 6 показывают, что цеолиты модифицированные хитозаном и хитозаном и солью меди связывают 99,95 и 99,96 % эндотоксина.. Это подтверждает, что модифицированные цеолиты могут быть эффективны для очистки растворов с очень низким содержанием эндотоксина.

Таблица 6 – % сорбции ЛПС *E. coli* модифицированными цеолитами согласно ЛАЛ-тесту

Сорбент	Содержание эндотоксина в исходном сорбенте, (EU)*	Содержание эндотоксина в растворе перед сорбцией, (EU)	Содержание эндотоксина в растворе после сорбции (EU)	Эффективность сорбции, %
Ц + Х	0.86±0.41	6716.48±536.99	2.86±0.03	99.95±0.02
Ц + Х + М	1.18±1.33	6716.48±536.99	2.67±0.001	99.96±0.001

* EU-эндотоксическая единица

Таким образом, сорбенты на основе цеолита, модифицированного хитозаном, могут быть использованы для очистки растворов, с концентрацией эндотоксина в пределах 0,05-1000 мкг/мл.

Список литературы / References:

1. Davydova V.N., Solov'eva T.F., Naberezhnykh G.A., Gorbach V.I., Yermak I.M. Chitosan as a binding agent for modification of endotoxin biological activity. *Handbook of Chitosan Research and Applications*, Nova Publishers, New York, 2011, pp. 85-102.
2. Шапкин Н.П., Ермак И.М., Разов В.И., Давыдова В.Н., Хальченко И.Г., Шкуратов А.Л. Получение органомодифицированных алюмосиликатов для очистки биологических растворов. *Журнал неорганической химии*, 2014, т. 59, № 6, с. 766-770. [Shapkin N.P., Ermak I.M., Rozov V.I., Davydov V.N., Halchenko I.G., Shkuratov A.L. Getting organo-aluminum silicates for purification of biological solutions. *Journal of Inorganic Chemistry*, 2014, vol. 59, no 6, pp. 766-770. (In Russ.)]
3. Troelstra A., Antal-Szalmas P., de Graaf-Miltenburg L.A., Weersink A.J., Verhoef J., Van Kessel K.P., Van Strijp J.A., Saturable CD14-dependent binding of fluorescein-labeled lipopolysaccharide to human monocytes. *Infect. Immun.*, 1997, vol. 65, pp. 2272-2277.
4. Davydova V.N., Volod'ko A.V., Sokolova E.V., Chusovitin E.A., Balagan S.A., Gorbach V.I., Galkin N.G., Yermak I.M., Solov'eva T.F. The supramolecular structure of LPS–chitosan complexes of varied composition in relation to their biological activity. *Carbohydrate Polymers*, 2015, vol. 123, pp. 115-121.
5. Davydova V.N., Naberezhnykh G.A., Yermak I.M., Gorbach V.I., Solov'eva T.F. Determination of binding constants of lipopolysaccharides of different structure with chitosan. *Biochemistry (Mosc.)*, 2006, vol. 71, pp. 332-339.
6. Davydova V.N., Bratskaya S.Yu., Gorbach V.I., Solov'eva T.F., Kaca W., Yermak I.M. Comparative study of electrokinetic potentials and binding affinity of lipopolysaccharides-chitosan complexes. *Biophys. Chem.*, 2008, vol. 136, pp. 1-6.

**ХИМИЧЕСКАЯ ТРАНСФОРМАЦИЯ И АККУМУЛЯЦИЯ В ПРИРОДЕ УГЛЕВОДОРОДОВ
PINUS PALLASIANA**

Ходаков Г.В.

ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет им. В.И. Вернадского»

пр. Вернадского, 4, г. Симферополь, 295492, РФ

e-mail: gennadii-hodakov@mail.ru

Аннотация. Идентифицированы углеводородные компоненты грунта, отобранного с глубины 1.5-2.0 метра неподалеку от поселка Сосняк (южный берег Крыма) на территории произрастания сосны крымской (*Pinus pallasiana*), ее растительных остатков и эфирного масла хвои. Химические структуры углеводородов сравнили между собой и компонентами нефти. В результате выявлена биогенетическая связь между ними.

Ключевые слова: углеводороды, изопреноиды, нефтеобразование, сосна крымская.

**CHEMICAL TRANSFORMATION AND ACCUMULATION IN THE NATURE OF HYDROCARBONS
PINUS PALLASIANA**

Khodakov G.V.

V.I. Vernadsky Crimean Federal University

Vernadskogo av., Simferopol, 29549, Russia

e-mail: gennadii-hodakov@mail.ru

Abstract. Identified hydrocarbon components of soil, sampled from a depth of 1.5-2.0 meters far from the village of Sosnjak (the southern coast of Crimea) in the territory of growing Crimean pine (*Pinus pallasiana*), its plant residues and essential oils of pine needles. The chemical structure of hydrocarbons compared with each other and the components of the oil. The result revealed biogenetic relationship between them.

Key words: hydrocarbons, isoprenoids, oil formation, Crimean pine.

Природными источниками органических компонентов атмосферы являются все виды живых организмов, начиная с одноклеточных бактерий и заканчивая высшими растениями и животными. Выделение в атмосферу этих веществ происходит в процессе дыхания, деятельности органов внешней секреции и выброса отходов метаболизма.

Особое внимание обращает на себя биоэмиссия летучих выделений хвойных растений. В их структуре абсолютно преобладают изопреноиды (70-95 % в зависимости от растительного таксона), которые являются компонентами эфирных масел [1].

Известно, что испарение растениями эфирных масел составляет 176 млн. тонн/год, причем «глобальная биоэмиссия углеводородов оценивается величиной 1,5·10⁹ тонн/год» [1, 2]. Количество летучих терпеноидов в сосновых лесах Красноярской лесостепи составляет в среднем по региону 40-47 кг/га [3].

Значение летучих выделений изопреновой природы для растений трудно переоценить, т.к., с одной стороны, их биосинтез является «эволюционно выработанным механизмом неспецифического иммунитета