

The impact of biomechanical properties of the corneoscleral shell on eye hydrodynamics (an experimental study)

E.N. Iomdina, O.A. Kiseleva, L.A. Nazarenko, N.Yu. Ignatieva,
V.N. Bagratashvili

It is hypothesized that impaired biomechanical properties of the sclera around the optic disc and, largely, in the corneoscleral shell may play an essential role in the pathogenesis of primary open-angle glaucoma (POAG). The paper's objective is to study experimentally the impact of elastic scleral properties on intraocular fluid (IF) outflow. We determined the mechanical characteristics and the crosslinking level of the sclera as well as hydrodynamic parameters in three groups of experimental animals: 1) intact eyes of young (2 months of age) and old (2 years) rabbits; 2) eyes treated in vivo by threose, which increases crosslinking of scleral collagen; 3a) eyes of young and old rabbits after they were treated by collalysin, a proteolytic enzyme, 3b) eyes of rabbits pre-treated by threose and subsequently treated by collalysin. The hydrodynamic parameters were measured using Glautest 60. Differential scanning calorimetry was used to reveal the crosslinking level of scleral collagen. The biomechanical parameters of sclera were determined by Autograph AGS-H. The normal age-related increase of scleral stiffness (Young's modulus) from 23.1 ± 4.2 MPa to 41.4 ± 6.3 MPa ($p < 0.05$) is followed by a moderate growth of cross links and a somewhat reduced IF outflow. At the same time, an increase of scleral stiffness (to 65.4 ± 6.0 MPa) caused by threose, i.e. a pathological growth of crosslinking, is accompanied by a certain intraocular pressure increase and a significant impairment of IF outflow. Collalysin-treated old rabbits revealed a fall in scleral stiffness (to 27.9 ± 4.9 MPa) and an improved IF hydrodynamics, whereas young animals showed only a slight change in these parameters. The sclera treated by threose and containing excessive cross links also became less stiff (43.4 ± 4.5 MPa) and improved IF hydrodynamics after collalysin treatment. It may be assumed that the biomechanical properties of sclera affect the eye hydrodynamics: IF outflow is deteriorating with the increase of scleral stiffness that is caused by excessively generated cross links in its collagen structures, which may be a risk factor for POAG. Proteolytic therapy with collalysin helps reduce the amount of these links, make the sclera less stiff and improve hydrodynamic parameters of the eye.

Key words: sclera, intraocular fluid, collagen, crosslinking, elasticity modulus.

Изучение изотопных эффектов тяжелой воды (D_2O) в биологических системах на примере клеток прокариот и эукариот

О.В. Мосин¹, И. Игнатов²

¹ – Московский государственный университет пищевых производств, Москва

² – Научно-исследовательский центр медицинской биофизики НИЦ МБ, София, Болгария

Контактная информация: доктор наук Европейской академии естествознания
Игнатов Игнат mbioph@dir.bg

Изучены изотопные эффекты дейтерия (D) в клетках различных таксономических групп прокариотических и эукариотических микроорганизмов, реализующих митолотрофные, хемогетеротрофные, фотоорганогетеротрофные и фотосинтетические способы ассимиляции углеродных субстратов при росте на средах с тяжелой водой (D_2O). Разработан метод ступенчатой адаптации клеток к D_2O , заключающийся в их рассеве на чашках Петри с твердыми (2% агар) питательными средами при ступенчатом увеличении градиента концентрации D_2O (от 0 до 98% D_2O) и последующей селекции устойчивых к D_2O клеток. В результате этой техники на максимально дейтерированной среде с 98% D_2O получены адаптированные к D_2O клетки, биологический материал которых вместо атомов водорода содержит атомы дейтерия с уровнем дейтерированности молекул 92-97,5% D. Использование адаптированных к D_2O клеток и выделенных из них дейтерированных природных соединений (белки, аминокислоты, нуклеозиды, пигменты, углеводы, липиды) может найти дальнейшее применение в биофизических исследованиях и биомедицинских технологиях.

Ключевые слова: дейтерий, тяжелая вода, изотопные эффекты, адаптация, бактерии, микроводоросли.

Введение

Одним из интереснейших биологических феноменов является способность некоторых микроорганизмов расти в искусственных условиях в тяжелой воде (D_2O) [8]. D_2O обладает высоким экологическим потенциалом вследствие отсутствия радиоактивности, что способствует ее использованию в качестве изотопного индикатора в химии, биологии и медицине [18]. В природных водах соотношение D/H составляет 1:5500 (в предположении, что весь дейтерий находится в форме D_2O) [20]. В действительности дейтерий присутствует в форме D_2O лишь в концентрированных растворах. При небольших концентрациях в воде он

присутствует в форме HDO, поскольку в смесях D_2O - H_2O с большой скоростью происходят реакции диссоциации и изотопного (H-D) обмена, приводящие к образованию HDO.

Изотопные эффекты, опосредованные разницей нуклеарных масс дейтерия и протия пары H/D, могут быть достаточно большими [4]. Химические реакции в D_2O протекают с более медленной скоростью, чем в H_2O , D_2O слабее ионизирована, чем H_2O , константа диссоциации D_2O меньше таковой для H_2O , растворимость органических и неорганических веществ в D_2O , как правило, ниже, чем в H_2O , водородные связи с участием дейтерия несколько прочнее обычных, подвижность

ионов D_3O^+ на 28,5% ниже H_3O^+ , а OD^- – на 39,8% ниже OH^- [24]. Для других ионов различие подвижностей в H_2O и D_2O составляет около 18% [3]. Константы диссоциации слабых кислот и оснований K_a снижаются в D_2O по сравнению с H_2O , а растворимость и растворяющая способность D_2O для многих неорганических и органических веществ, как правило, ниже, чем у H_2O , хотя известны и обратные факты.

Систематическое изучение воздействия D_2O на клетки животных, растений и микроорганизмов в нашей стране начато сравнительно недавно [1]. Эксперименты показали, что D_2O действует негативно на жизненные функции организмов, замедляет клеточный метаболизм и ингибирует митоз в стадии профазы; это происходит даже при использовании обычной природной воды с повышенным содержанием D_2O или HDO [14]. Клетки животных способны выдерживать до 30% D_2O , растений – 50% D_2O , микроводорослей – 70% D_2O , а клетки простейших и микроорганизмов – 95% D_2O [9].

С развитием новых биотехнологических подходов появилась возможность использовать в качестве биомоделей для научных целей и прикладных исследований, в т.ч. для направленного синтеза D-меченных природных соединений, адаптированные к D_2O клетки микроорганизмов и микроводорослей. Традиционным методом при этом является выращивание микроорганизмов в средах, содержащих максимальные концентрации D_2O и дейтерированных субстратов, – например, [D]метанол [10]. В процессе роста клеток в D_2O в них синтезируются молекулы биологически важных природных соединений (ДНК, белки, аминокислоты, нуклеозиды, пигменты, углеводы,

липиды), атомы водорода при углеродных скелетах которых полностью заменены на дейтерий. Их выделяют из дейтерированной биомассы, полученной на средах с высокими концентрациями D_2O и дейтерированными субстратами, используя комбинацию физико-химических методов выделения – гидролиз, осаждение и экстракцию органическими растворителями и хроматографическую очистку методом колоночной хроматографии с применением различных сорбентов. Такие дейтерированные молекулы претерпевают структурно-адаптационные модификации, необходимые для нормального функционирования клетки в D_2O .

Биологическая адаптация к D_2O интересна не только с научной точки зрения, но она также позволяет получать уникальный дейтерированный биологический материал для диагностических биомедицинских целей, а также решения задач молекулярной организации клетки методом ЯМР-спектроскопии [17]. Тенденции к применению дейтерия в качестве изотопной метки обусловлены отсутствием радиационной опасности и возможностью определения локализации дейтерия в молекуле методами высокого разрешения: спектроскопией ЯМР [19], ИК-спектроскопией [21] и масс-спектрометрией [11]. Это позволило за последние годы существенно повысить эффективность проведения многочисленных биомедицинских исследований с D_2O и дейтерированными природными соединениями *de novo*, а также изучать структуру и механизм их действия на молекулярном уровне.

Данная работа является продолжением наших исследований, связанных с принципиальной возможностью практического использования различных кле-

ток бактерий, микроводорослей и растений, для синтеза D-меченных природных соединений в условиях максимально дейтерированных сред с D_2O . Целью работы являлось изучение изотопных эффектов D_2O в клетках различных таксономических групп микроорганизмов и микроводорослей, осуществляющих митотрофный, хемогетеротрофный, фотоорганогетеротрофный и фотосинтетический пути ассимиляции углеродных субстратов.

Материалы и методы

Объектами исследования являлись две хемогетеротрофные грамположительные бактерии *Bacillus subtilis* и *Brevibacterium methylicum* (последняя способна к метилотрофии), фотоорганогетеротрофная галобактерия *Halobacterium halobium* и фотосинтезирующая одноклеточная зеленая микроводоросль *Chlorella vulgaris*, полученные из Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов (ВКПМ) Государственного научно-исследовательского института генетики и селекции промышленных микроорганизмов ГосНИИГенетика.

1. *Brevibacterium methylicum* ВКПМ В 5652, лейцинзависимый штамм грамположительных факультативных метилотрофных бактерий, ассимилирующий метанол по РМФ-циклу фиксации углерода.

2. *Bacillus subtilis* В-3157, полиауксотрофный по гистидину, тирозину, аденину и урацилу штамм грамположительных хемогетеротрофных бактерий, релизующий гексозо-6-моно-фосфатный (ГМФ) путь ассимиляции углеводов.

3. *Halobacterium halobium* ET 1001, фотоорганогетеротрофный каротиноид-

содержащий штамм экстремальных галобактерий, синтезирующий трансмембранный белок бактериородопсин.

4. *Chlorella vulgaris* В 8765, зеленая одноклеточная фотосинтезирующая микроводоросль.

Для приготовления питательных сред применяли D_2O (99,8 ат.% D), DCl (95,5 ат.% D) и [D]метанол (97,5 ат.% D), полученные из Российского научно-исследовательского центра «Изотоп» (Санкт-Петербург, РФ). Неорганические соли и D, L- глюкозу (Reanal, Венгрия) предварительно перекристаллизовывали в D_2O , D_2O дистиллировали в присутствии $KMnO_4$ с последующим контролем изотопной чистоты 1H ЯМР-спектроскопией на приборе Bruker WM-250 (ФРГ) (рабочая частота 70 МГц, внутренний стандарт Me_4Si).

Для выращивания использовали следующие питательные среды (количества компонентов приведены в г/л):

1. Минимальная среда М9 для выращивания факультативных метилотрофных бактерий *B. methylicum*, на основе ступенчато-увеличивающихся концентраций D_2O (от 0; 24,5; 49,0; 73,5 до 98 об.%* D_2O) и 2% метанолом/[D]метанолом (г/л): KH_2PO_4 3; Na_2HPO_4 6; NaCl 0,5; NH_4Cl 1.

2. Среда ГС1 для выращивания хемогетеротрофной бактерии *B. subtilis* (на основе 99,8% D_2O): глюкоза 120; гидролизат дейтеро-биомассы *B. methylicum* 25; NH_4NO_3 30; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 20; $CaCO_3$ 20.

3. Среда ГС2 для выращивания фотоорганогетеротрофной галобактерии *H. halobium* (на основе 99,8% D_2O): NaCl 250; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 20; KCl 2; $CaCl_2 \cdot 6H_2O$ 0,065; цитрат натрия 0,5; гидролизат дейтеро-биомассы *B. methylicum* 20, витами-

* Здесь и далее использованы проценты по объему, об.%

ны (биотин – $1 \cdot 10^{-4}$; фолиевая кислота – $1,5 \cdot 10^{-4}$; витамин B_{12} – $2 \cdot 10^{-5}$).

4. Среда Тамия для выращивания фотосинтезирующей зеленой микроводоросли *C. vulgaris* (на основе 99,8% D_2O): KNO_3 – 5,0; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – 2,5; KH_2PO_4 – 1,25; $FeSO_4$ – 0,003; микроэлементы ($MnSO_4 \cdot 2H_2O$ – $3 \cdot 10^{-4}$; $CaCl_2 \cdot 6H_2O$ – 0,065; $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ – $4 \cdot 10^{-5}$; $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ – $5 \cdot 10^{-5}$, $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ – $5 \cdot 10^{-6}$).

Стартовым материалом для выращивания хемогетеротрофных бактерий и галобактерий являлась дейтеро-биомасса факультативных метилотрофных бактерий *B. methylicum*, полученная в условиях многоступенчатой адаптации на твердых (2% агар) средах М9 с D_2O . Полученную дейтеро-биомассу *B. methylicum* (выход 100 г по влажному весу с 1 л среды) автоклавировали в 0,5 н. HCl (в D_2O) (0,8 атм, 30 мин), нейтрализовали 0,1 н. KOH (в D_2O) (рН 7,0) и использовали в качестве источника дейтерированных ростовых субстратов для адаптации и выращивания хемоорганогетеротрофных бактерий *B. subtilis* и галобактерий *H. halobium*.

Выращивание грамположительных бактерий *B. subtilis* проводили на ГС1 среде при 34°C в колбах Эрленмейера вместимостью 250 мл с наполнением средой до 50 мл в условиях интенсивной аэрации на орбитальном шейкере *Biorad* (100 об/мин) (Польша), используя в качестве источников дейтерированных субстратов D_2O и гидролизат дейтеро-биомассы *B. methylicum*. Галобактерии *H. halobium* выращивали в аналогичных условиях на ГС2 среде при 37°C при освещении лампами дневного света ЛБ-40. Выращивание микроводоросли *C. vulgaris* проводили на синтетической среде Тамия при 32°C в фотореакторе с барботажем CO_2 . Рост оценивали по способности к образованию отдельных колоний на по-

верхности твердых агаризованных сред с D_2O , а также по величине ОП суспензии клеток, измеренной на спектрофотометре Beckman-DU6 (США) при $\lambda=620$ нм. После 6-7 суток культивирования клетки отделяли центрифугированием (10000 об/мин, 20 мин) на центрифуге Т-24 (ФРГ). Биомассу промывали D_2O и экстрагировали смесью органических растворителей хлороформ-метанол-ацетон (2:1:1) для отделения липидов и пигментов. Полученный осадок высушивали до постоянной массы (10-12 мг) и использовали в качестве фракции суммарных белков биомассы, а жидкий экстракт – в качестве липидной фракции. [D]рибоксин выделяли из КЖ *B. subtilis* адсорбцией активированным углем (12 ч, 4°C), экстракцией 0,3 М NH_4 -формиатным буфером (рН 8,9) и перекристаллизацией в 80% этаноле ($[\alpha]_{D_2O} = +1,61^\circ$, выход 3,1 г/л (80%)). БР выделяли из фракции пурпурных мембран *H. halobium* по методу Остерхельта, усовершенствованному нами [22].

Гидролиз дейтерированных белков биомассы проводили при 110°C в течение 24 ч в запаянных стеклянных ампулах в 50-ти-кратном избытке 6 н. DCl (в D_2O), используя 10 мг сухой дейтеро-биомассы. Реакционную массу суспендировали в горячей D_2O , фильтровали. Гидролизат упаривали в ротормном испарителе РВО-64 (Венгрия) при 60°C. Остатки DCl удаляли в эксикаторе путем выдерживания над твердым NaOH. Для проведения гидролиза внутриклеточных углеводов 50 мг сухой делипидизованной дейтеро-биомассы помещали в круглодонную колбу вместимостью 250 мл, добавляли 50 мл D_2O и 1,6 мл 25% H_2SO_4 и кипятили с обратным водяным холодильником в течение 90 мин. По охлаждении реакционную смесь суспендировали в 50 мл D_2O и ней-

трализовали 2 н. раствором $Ba(OH)_2$ (в D_2O) до рН 7,0. Выпавший осадок $BaSO_4$ отделяли центрифугированием (15000 об/мин, 5 мин), супернатант декантировали и упаривали в ротормном испарителе при 60°C.

Аминокислотный анализ белковых гидролизатов проводили на приборе Biotronic LC 5001 (ФРГ); 230x3,2 мм; рабочее давление 50-60 атм; скорость подачи Na-цитратного буфера 18,5, нингидрина – 9,25 мл/ч; детекция при $\lambda=570$ нм и $\lambda=440$ нм (для пролина).

Анализ углеводов осуществляли на жидкостном хроматографе Knauer (ФРГ), снабженным насосом Gilson (ФРГ) и рефрактометром Waters K 401 (ФРГ); неподвижная фаза: Separon NH_2 , 10 мкм; подвижная фаза: CH_3CN-H_2O , (75:25); скорость подачи 0,6 мл/мин.

Липиды анализировали на хроматографе Beckman Gold System (США), снабженным насосом Model 166 и детектором Model 126 (США); неподвижная фаза: Ultrasphere ODS 5 мкм; 4,6 x 250 мм; подвижная фаза: линейный градиент 5 мМ $KH_2PO_4-CH_3CN$; 100% в течение 50 мин; скорость подачи – 0,5 мл/мин; детекция при $\lambda=210$ нм.

Масс-спектры FAB регистрировали на импульсном масс-спектрометре VG-70 SEQ (Fisons, VG Analytical, США) с цезиевым источником Cs^+ на глицериновой матрице с ускоряющим напряжением 5 кВ и ионным током 0,6-0,8 мА. Уровни включения дейтерия в молекулы аминокислот белковых гидролизатов определяли методом масс-спектрометрии ЭУ в виде метиловых эфиров N-(диметиламино)нафтален-1-сульфонил хлоридных (дансильных) производных аминокислот на приборе MB-80A (Hitachi, Япония) при ионизирующем напряжении 70 эВ и температуре катодного источника 180-200°C

по ранее разработанной нами методике [12]. Расчет уровней дейтерированности молекул проводили по соотношению вкладов пиков молекулярных ионов $[M]^+$ дейтерированных соединений, выделенных с D_2O -средах и контроля, полученного в H_2O -среде.

Результаты и их обсуждение

При воздействии воды на биологические объекты их реакция изменяется в зависимости от изотопного состава воды и величины изотопных эффектов, определяемых разницей констант скоростей химических реакций kh/kd . в H_2O и D_2O . Самые большие изотопные эффекты с соотношением $kh/kd = 6-8$ наблюдаются в D_2O для C-H/C-D, N-H/N-D и O-H/O-D связей. Изотопные эффекты оказывают влияние не только на физико-химические свойства, но и на биологические свойства D_2O . Эксперименты с D_2O показали (рис. 1), что микроводоросли способны расти на 70% D_2O , метилотрофные бактерии – 75% D_2O , хемогетеротрофные бактерии – 82% D_2O , а галофилы – 95% D_2O .

В ходе эксперимента были получены адаптированные к максимальным концентрациям D_2O клетки относящихся к различным таксономическим группам микроорганизмов, реализующих метилотрофный, хемогетеротрофный, фотоорганогетеротрофный и фотосинтетический пути ассимиляции углеродных субстратов, – факультативные метилотрофные бактерии *B. methylicum*, хемогетеротрофные бактерии *B. subtilis*, галобактерии *H. halobium* и микроводоросли *C. vulgaris*.

Выбор ассимилирующих метанол факультативных метилотрофных бактерий *B. methylicum* был связан с разработкой новых биотехнологий получения метилотрофной дейтеро-биомассы на [D]ме-

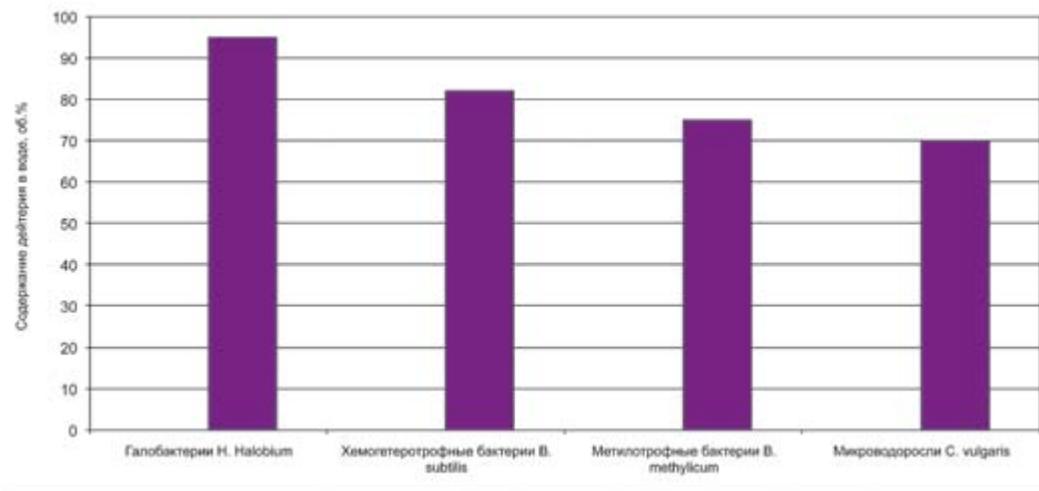


Рис. 1. Выживаемость клеток изученных микроорганизмов в воде с различными содержаниями дейтерия.

танолу и D₂O и ее дальнейшего использования как источника дейтерированных ростовых субстратов для выращивания других штаммов-продуцентов.

Выбор фотоорганогетеротрофных галобактерий *H. halobium* был обусловлен перспективами дальнейшего выделения ретинальсодержащего трансмембранного белка бактериородопсина (БР) – хромопротеида из 248 аминокислотных остатков, содержащего в качестве хромоформной группы эквимолекулярную смесь 13-цис- и полностью 13-транс-ретинольного C₂₀-каротиноида, связанного с остатком Lys-216 и определяющего пурпурно-красный цвет галобактерий [5]. БР выполняет в клетках галобактерий роль АТФ-зависимой транслоказы, создающей электрохимический градиент протонов H⁺ на поверхности клеточной мембраны, энергия которого используется клеткой для синтеза АТФ в анаэробном фотосинтетическом фосфорилировании.

Использование хемогетеротрофных бактерий *B. subtilis* определялось необходимостью препаративного выделения

производимого этой бактерией дейтерированного рибонуклеозиды – рибоксина (уровень дейтерированности 62,5% D) для медицинской диагностики, а использование фотосинтезирующей микроводоросли *C. vulgaris* было связано с исследованием биосинтеза в D₂O дейтерированных хлорофилловых и каротиноидных пигментов (уровень дейтерированности 95-97% D) для их последующего использования для реконструкции искусственных мембран.

Для адаптации клеток к D₂O использовали ступенчато увеличивающийся градиент концентрации D₂O, поскольку предполагалось, что постепенное привыкание организма к дейтерию будет оказывать благоприятный эффект на ростовые и физиологические параметры. Стратегия адаптации к D₂O показана в табл. 1 на примере метилотрофных бактерий *B. methylicum*, дейтеро-биомасса которых использовалась в дальнейших экспериментах в качестве D-меченных ростовых субстратов для выращивания хемогетеротрофных и фотоорганогетеротрофных бактерий.

Изотопный состав ростовых сред и характеристики роста метилотрофных бактерий *B. methylicum* в процессе адаптации к D₂O

Номер опыта	Компоненты среды, об. %				Лag-период, ч	Выход микробной биомассы, % от контроля	Время генерации, ч
	H ₂ O	D ₂ O	метанол	[D] метанол			
1	98,0	0	2	0	20	100	2,2
2	98,0	0	0	2	30	92,3	2,4
3	73,5	24,5	2	0	32	90,6	2,4
4	73,5	24,5	0	2	34	85,9	2,6
5	49,0	49,0	2	0	40	70,1	3,0
6	49,0	49,0	0	2	44	60,5	3,2
7	24,5	73,5	2	0	45	56,4	3,5
8	24,5	73,5	0	2	49	47,2	3,8
9	0	98,0	2	0	58	32,9	4,4
10	0	98,0	0	2	60	30,1	4,9
10'	0	98,0	0	2	40	87,0	2,8

Примечание: Данные опытов 1-10 приведены при выращивании бактерий в минимальных средах M9, содержащих 2% метанол/[D]-метанол и указанные концентрации D₂O. Данные опыта 10' приведены для адаптированных к максимальному содержанию дейтерия в среде бактерий при выращивании в среде с максимальными концентрациями D₂O. В качестве контроля использовали опыт 1, где применяли обычную воду и метанол.

Стратегия адаптации к D₂O заключалась в рассеве исходных клеток микроорганизмов на чашках Петри с твердыми агаризованными средами с 2%-м агаром при ступенчатом увеличении концентрации D₂O в них (от 0; 24,5; 49,0; 73,5 до 98% D₂O) и последующей селекции устойчивых к D₂O клеток. Выросшие на средах с низким градиентом концентрации D₂O клетки переносили на среды с большим градиентом концентрации, вплоть до 98% D₂O. На конечном этапе на максимально дейтерированной среде с 98% D₂O были выделены отдельные клеточные колонии, представляющие собой потомство одной единственной клетки, устойчивой к действию D₂O. Затем колонии переносили в жидкие питательные

среды такого же состава, приготовленные на основе D₂O, и культивировали в течение 5 сут при 34°C. Уровень выживаемости клеток на полностью дейтерированной среде составил не более 40-50%. За ходом адаптации наблюдали по изменениям продолжительности лag-периода, времени клеточной генерации и выходов микробной биомассы, а также по способности к образованию отдельных колоний на поверхности твердых агаризованных сред с D₂O и подсчету клеток.

Все адаптированные к D₂O клетки сохранили способность размножаться в D₂O-средах, а также биосинтетические способности к синтезу аминокислот, белков и нуклеозидов. Общей особенностью адаптированных к D₂O клеток микроор-

ганизмов при росте в D₂O-средах было увеличение лаг-периода и времени клеточной генерации при уменьшении выходов микробной биомассы. Значения этих параметров коррелировали с уровнями содержания D₂O в ростовых средах, с фиксированием самых низких значений в максимально дейтерированной среде (опыты 9, 10, табл. 1). В отличие от адаптированных к D₂O микроорганизмов, рост исходных микроорганизмов в максимально дейтерированных средах с D₂O ингибировался дейтерием. Выходы биомассы в максимально дейтерированных средах составили 85-90% для разных таксономических групп микроорганизмов. Адаптированные микроорганизмы имели несколько сниженные уровни накопления микробной биомассы и увеличенные времена клеточной генерации при росте в D₂O-средах.

Полученный результат в опытах по адаптации метилотрофных бактерий *B. methylicum* к D₂O позволил использовать гидролизаты метилотрофной дейтеробиомассы, полученной в процессе многоступенчатой адаптации к D₂O, в качестве дейтерированных ростовых субстратов для выращивания хемогетеротрофных бактерий *B. subtilis* и фотоорганогетеротрофных галобактерий *H. halobium*. Усваиваемость биомассы метилотрофов клетками простейших и эукариот составляет 85-99%, а производительность метилотрофов, измеренная по уровню конверсии метилового спирта, достигает 50-60% [23]. При разработке питательных сред на основе дейтеро-биомассы метилотрофных бактерий учитывалось, что метилотрофные бактерии при росте на метаноле способны синтезировать большое количество полноценных белков (до 55% от веса сухого вещества), 15-17% полисахаридов, 10-12% липидов (в основном, фосфолипидов) и 18% золь-

ных веществ [13]. Причем эта способность сохраняется при росте на средах, содержащих D₂O и [D]метанол. Чтобы обеспечить высокие выходы этих соединений и минимизировать реакции обратного изотопного (H-D) обмена в аминокислотных остатках молекул белков, гидролиз дейтеро-биомассы проводили автоклавированием в 0,5 н. DCl (в D₂O).

Учитывая способы ассимиляции углеродных субстратов, адаптацию хемогетеротрофных *B. subtilis* и галобактерий *H. halobium* проводили путем посева исходных бактерий до отдельных колоний на соответствующих твердых (2% агар) питательных GC1 и GC2 средах на основе 99,8% D₂O и гидролизата дейтеро-биомассы *B. methylicum* и последующей селекцией колоний по признаку устойчивости к D₂O. В отличие от D₂O, D-субстраты из гидролизата дейтеробиомассы не оказывали существенного влияния на параметры роста исследуемых микроорганизмов. Выход [D]рибозина, зафиксированный при росте *B. subtilis* на максимально дейтерированной GC 1 среде, составил 3,9 г/л при уровне ассимиляции глюкозы из КЖ 40 г/л. Фракционирование [D]рибозина из КЖ штамма продуцента производили адсорбцией/десорбцией на поверхности активированного угля, экстракцией 0,3 М NH₄-формиатным буфером (pH 8,9) с последующей перекристаллизацией в 80% этаноле и колоночной ионообменной хроматографии на катионообменнике AG50WX 4, уравновешенным 0,3 М NH₄-формиатным буфером с 0,045 М NH₄Cl. Уровень дейтерированности рибозина по данным масс-спектрометрии FAB составил пять атомов дейтерия (62,5% D) с включением трех атомов дейтерия в рибозный и двух атомов дейтерия в гипоксантиновый фрагменты молекулы.

Для адаптации к D₂O микроводоросли *C. vulgaris* использовали жидкие минеральные среды Тамия, содержащие 25, 50, 75 и 98% D₂O. В случае с *C. vulgaris* и *H. halobium* и использовали освещение лампами дневного света ЛБ-40, поскольку оба микроорганизма развиваются в присутствии света. Выделенные селекцией отдельные колонии клеток, устойчивые к D₂O, выращивали в жидких средах аналогичного состава с 99,8 ат.% D₂O для наработки дейтеро-биомассы.

При выращивании *H. halobium* в GC 2 среде в клетках синтезировался каротиноидсодержащий фиолетовый пигмент, по спектральному соотношению белкового и хромофорного фрагментов молекулы D₂₈₀/D₅₆₈ 1,5:1 идентичный природному БР. Рост галобактерий в D₂O-среде ингибировался незначительно по сравнению с контрольной протонированной средой, что существенно упрощает оптимизацию условий наработки дейтерированной биомассы галобактерий, заключающейся в выращивании галобактерий в дейтерированной среде с 20% гидролизатом дейтеро-биомассы *B. methylicum*, выделением фракции пурпурных мембран, отделением низко- и высокомолекулярных примесей, клеточной РНК, каротиноидов и липидов с последующим растворением белка в 0,5% SDS-Na и осаждением метанолом. Суммарный уровень дейтерированности БР, рассчитанный по уровням дейтерированности аминокислот белкового гидролизата, составил 95% D.

Проведенные нами исследования свидетельствуют, что способность к адаптации к D₂O у разных таксономических групп микроорганизмов различная и определяется как таксономической принадлежностью микроорганизмов, так и особенностями метаболизма, функцио-

нированием различных путей ассимиляции субстратов, а также эволюционной нишей, которую занимает исследуемый объект. При этом чем ниже уровень эволюционного развития организма, тем лучше он приспособляется к присутствию дейтерия в среде. Так, из изученных объектов наиболее примитивными в эволюционном плане (строение клеточной мембраны, биохимия, устойчивость к внешним факторам среды) являются галобактерии, относящиеся к археобактериям, стоящие обособленно как от прокариотических, так и от эукариотических микроорганизмов, обнаруживающих повышенную устойчивость к D₂O, и практически не нуждающиеся в адаптации к D₂O, что нельзя сказать о микроводорослях, которые, будучи эукариотами, труднее всех адаптируются к D₂O и проявляют ингибирование роста в 70-75% D₂O.

В процессе адаптации к D₂O немаловажную роль играет состав питательной среды, поскольку причинами ингибирования роста клеток и их гибели могут стать изменения соотношения синтезируемых метаболитов: аминокислот, белков и углеводов в D₂O-средах. Отмечено, что адаптация к D₂O проходит легче в комплексных средах, содержащих БВК дрожжей, при постепенном увеличении содержания дейтерия в среде, так как чувствительность к D₂O разных жизненно важных систем различна. Как правило, даже высокодейтерированные среды содержат протоны от 0,2-10% H. Остаточные протоны в момент адаптации к D₂O облегчают перестройку к изменившимся условиям, предположительно встраиваясь именно в те участки, которые наиболее чувствительны к замене атомов водорода на дейтерий. Также были выявлены существенные различия в морфологии дейтерированных

и протонированных клеток *C. vulgaris*. Клетки *C. vulgaris*, выращенные на D_2O -средах, имели в 2-3 раза большие размеры и более толстую клеточную стенку, чем контрольные клетки, выращенные на обычной протонированной среде. Тамия с обычной водой; распределение в них ДНК было неравномерным. В некоторых случаях на поверхности мембран наблюдались участки, состоящие из плотно упакованных складок цитоплазматической мембраны, напоминающие мезосомы. Кроме того, для дейтерированной *C. vulgaris* было также характерно резкое изменение формы клеток и направления их деления. Наблюдавшееся деление не заканчивалось обычным расхождением дочерних клеток, а приводило к образованию атипичных клеток, описанных в работах других авторов [2]. Наблюдаемые морфологические изменения, связанные с торможением роста дейтерированных клеток, обусловлены перестройкой в процессе адаптации к D_2O . Факт, что дейтерированные клетки имеют более крупные размеры (кажущийся размер в 2-4 раза превосходит размер протонированных клеток), является общебиологическим и наблюдается при выращивании в D_2O целого ряда других адаптированных нами прокариотических и эукариотических клеток.

Полученные нами данные, в целом, подтверждают устойчивое представление о том, что адаптация к D_2O является фенотипическим явлением, поскольку адаптированные к D_2O клетки возвращаются после их переноса в обычные водные среды к нормальному росту после некоторого лаг-периода. В то же время эффект обратимости роста на H_2O/D_2O средах не исключает возможности того, что определенный генотип детерминирует проявление одного и того же фенотипического

признака в средах различного изотопного состава. При попадании клетки в тяжёловодородную среду, лишённую протонов, из неё не только удаляется протонированная вода за счет реакции обмена H_2O-D_2O , но и происходит быстрый изотопный (H-D) обмен в гидроксильных (-OH), сульфгидрильных (-SH) и аминогруппах (-NH₂) молекул всех органических соединений, включая белки, нуклеиновые кислоты, углеводы и липиды. Известно, что в этих условиях только ковалентная C-H связь не подвергается изотопному обмену, и вследствие этого только соединения со связями типа C-D могут синтезироваться *de novo* [7]. В зависимости от положения атома дейтерия в молекуле, различают первичные и вторичные изотопные эффекты, опосредованные межмолекулярными взаимодействиями. В этом аспекте наиболее важными для структуры макромолекулы являются динамические короткоживущие водородные (дейтериевые) связи, формирующиеся между соседними атомами дейтерия (водорода) и гетероатомами кислорода, углерода, азота, серы и D_2O из окружающей среды, играющие главную роль в поддержании пространственной структуры макромолекул и в межмолекулярных взаимодействиях. Другое важное свойство определяется пространственной структурой D_2O , имеющей тенденцию сближать гидрофобные группы макромолекул, чтобы минимизировать их эффект на водородную (дейтериевую) связь в D_2O . Поэтому структура макромолекул белков и нуклеиновых кислот в присутствии D_2O стабилизируется [15].

Полученные экспериментальные данные свидетельствуют о том, что клетка реализует особые адаптивные механизмы, способствующие функциональной реорганизации работы жизненно важ-

ных систем в D_2O . Так, нормальному синтезу и функционированию в D_2O таких жизненно важных соединений как нуклеиновые кислоты и белки способствует поддержание их структуры посредством формирования водородных (дейтериевых) связей в молекулах. Связи, сформированные атомами дейтерия, различаются по прочности и энергии от аналогичных водородных связей. Несколько большая прочность связи D-O по сравнению с H-O обуславливает различия в кинетике реакций в D_2O и H_2O . По теории абсолютных скоростей разрыв C-H-связей происходит быстрее, чем C-D-связей, подвижность иона D^+ меньше, чем подвижность H^+ , константа ионизации D_2O несколько меньше константы ионизации H_2O [6]. Эти факторы приводят к замедлению скоростей ферментативных реакций в D_2O [16]. Однако существуют и такие реакции, скорость которых в D_2O выше, чем в H_2O . В основном, это реакции, катализируемые ионами D_3O^+ или H_2O^+ или OD^- и OH^- .

Отмечено, что вследствие изотопных эффектов дейтерия в D_2O синтезируются молекулы с другими структурно-функциональными свойствами и активностью, чем молекулы, образованные с участием водорода. Они также могут стать причиной различий в синтезах нуклеиновых кислот, которые могут приводить к структурным и функциональным изменениям в клетке и её органеллах. Так, структурно-динамические свойства клеточной мембраны, которые в большинстве зависят от качественного и количественного состава липидов, также могут изменяться в присутствии D_2O . В клетках бактерий мембрана является одним из важнейших инструментов регуляции метаболизма, объединяя в себе аппараты биосинтеза полисахари-

дов, трансформации энергии, снабжения клетки питательными веществами и участвуя в биосинтезе белков, нуклеиновых кислот и липидов. Очевидно, при адаптации к D_2O мембраны играют важную роль. Однако окончательно не выяснено, что происходит с мембранами, как они реагируют на замену H^+ на D^+ и какое это имеет значение для выживания клеток в D_2O -среде, лишённой протонов.

Сравнительный анализ липидного состава дейтерированных клеток хемогетеротрофной бактерии *B. subtilis*, полученных при росте в максимально дейтерированной D_2O -среде (ГС1-среда), осуществлённый методом ВЭЖХ, показал существенные различия в количественном составе мембранных липидов по сравнению с липидами, полученными на обычной воде (рис. 2а, б). Характерно, что в образце, полученном в D_2O -среде, соединения, имеющие времена удерживания 33,38; 33,74; 33,26 и 36,03 мин, не детектируются (рис. 2б). Полученный результат, по-видимому, объясняется тем, что клеточная мембрана является одной из первых органелл клетки, испытывающей воздействие D_2O , и тем самым компенсирует реалогические параметры мембраны (вязкость, текучесть, структурированность) изменением не только количественного, но и качественного состава липидов. Аналогичная ситуация наблюдалась и с разделением других природных соединений (белки, аминокислоты, углеводы), выделенных из дейтерированной биомассы с D_2O -среды.

Анализ аминокислот белковых гидролизатов и внутриклеточных углеводов, выделенных из клеток *B. subtilis*, также выявил заметные различия в биосинтезе этих природных соединений в максимально дейтерированной D_2O -среде (ГС1-среда). Белковый гидролизат

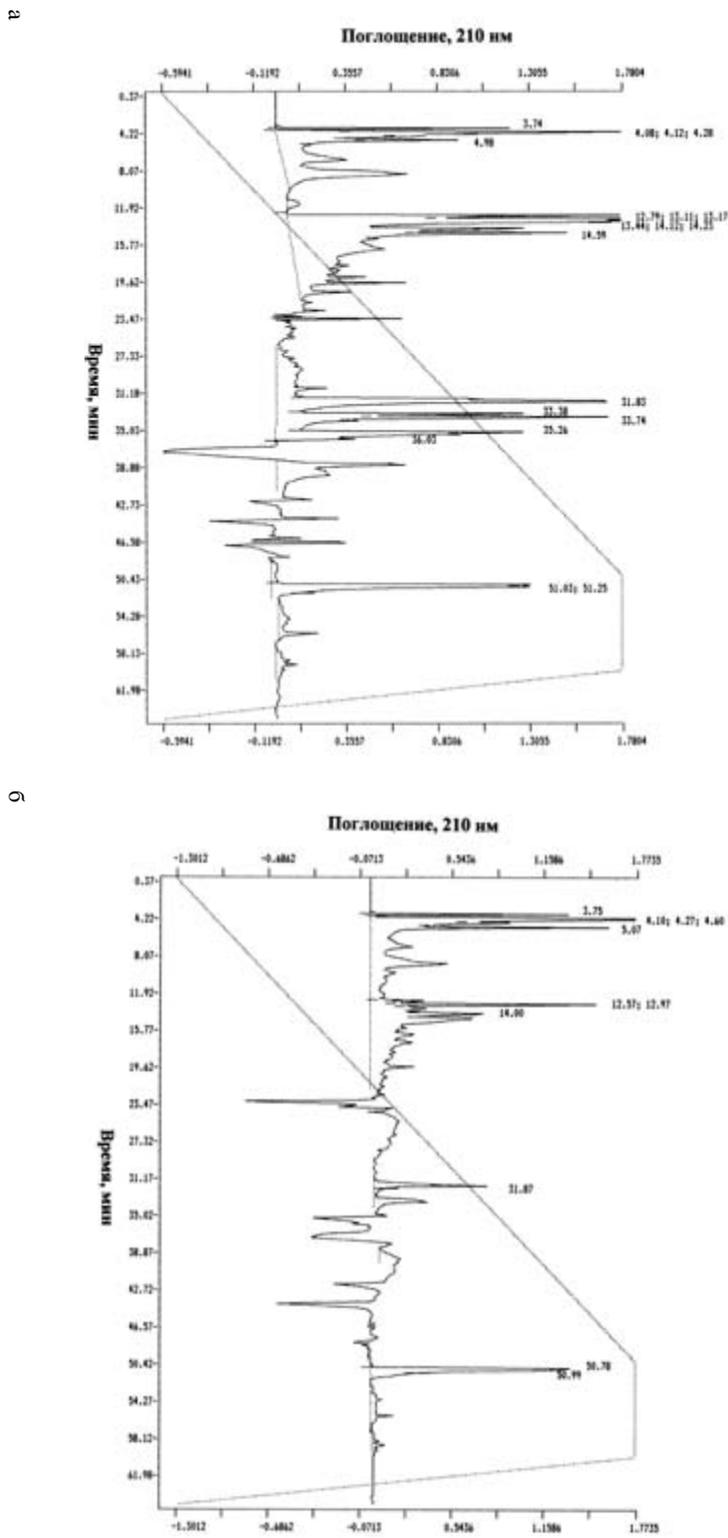


Рис. 2. Липидные профили протонированных (а) и дейтерированных (б) клеток бактерии *B. subtilis*, выделенных с максимальной дейтерированной D₂O-среды (ГС1-среда); хроматограф Beckman Gold System (США), детектор Model 126 (США); неподвижная фаза: Ultrasphere ODS 5 мкм; 4,6 x 250 мм; подвижная фаза: линейный градиент 5 мМ КН₂РО₄-ацетонитрил (показан пунктиром); скорость элюции: 0,5 мл/мин; детекция при λ=210 нм. Пики на хроматограммах с временами удерживания: 3,75 (место 3,74 в контроле); 4,10; 4,27; 4,60 (место 4,08; 4,12; 4,28 в контроле); 5,07 (место 4,98 в контроле); 12,57; 12,97 (место 12,79; 13,11; 13,17 в контроле); 14,00 (место 14,59 в контроле); 31,87 (место 31,83 в контроле); 33,38; 33,74; 33,26; 36,03; 50,78; 50,99 (место 51,03; 51,25 в контроле) соответствуют индивидуальным внутриклеточным липидам.

B. subtilis представлен пятнадцатью идентифицированными аминокислотами (за исключением пролина, который детектировался при λ=440 нм) при выходах аминокислот, сопоставимых с потребностями используемых бактерий в источниках углерода и аминного азота (табл. 2). Индикатором, определяющим высокую эффективность включения дейтерия в белковый гидролизат, служат высокие

уровни дейтерированности молекул аминокислот, которые варьируют от 49% D для лейцина/изолейцина до 97,5% D для аланина.

Фракция внутриклеточных углеводов *B. subtilis* при росте в максимально дейтерированной D₂O-среде (ГС1-среда) в табл. 3 (нумерация приведена по последовательности их элюции с колонки) представлена моносахаридами (глюкоза,

Таблица 2

Аминокислотный состав белкового гидролизата *B. subtilis*, полученный с максимально дейтерированной среды*, и уровни дейтерированности молекул

Аминокислота	Выход, % от сухого веса 1 г биомассы	Величина молекулярного иона производных аминокислот [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	—	—

Примечания:

* Данные получены на ГС1 среде с 99,8% D₂O и 2% гидролизатом дейтеро-биомассы *B. methylcum*.

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

*** При подсчете уровня дейтерированности протоны (дейтероны) при карбоксильных COOH- и аминок NH₂ группах молекул аминокислот не учитывались из-за лёгкости изотопного (H-D) обмена.

**** Прочерк означает отсутствие данных.

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). Выход глюкозы в дейтерированном образце составляет 21,4% от сухого веса, то есть выше, чем фруктозы (6,82%), рамнозы

емые изменения клеток при росте на D₂O сопровождались изменениями физиологических и морфологических параметров клетки, а также соотношения синтезируемых белков, аминокислот, углеводов и липидов, по-видимому, обусловлены структурно-функциональной перестройкой в процессе адаптации к D₂O. Суммируя полученные данные, можно сделать

Таблица 3

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

Углевод	Содержание в биомассе, в % от сухого веса 1 г биомассы		Уровни дейтерированности молекул, %
	Протонированный образец (контроль)	Образец, полученный в 99,8% D ₂ O	
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	—

Примечания:

* Данные получены на GC1 среде с 99,8% D₂O и 2% гидролизатом дейтеро-биомассы *B. methylicum*.

(3,47%), арабинозы (3,69%) и мальтозы (11,62%). Их выходы существенно не отличались от контроля в H₂O, за исключением сахарозы, которая в дейтерированном образце не детектировалась (табл. 3). Уровни дейтерированности углеводов составили от 90,7% D для арабинозы до 80,6% D для глюкозы.

Выводы

Полученные экспериментальные данные свидетельствуют о том, что эффекты, наблюдаемые при клеточной адаптации к D₂O, относятся к комплексному многофакторному воздействию, влияющему на многие системы организма. Наблюда-

вывод, что чувствительности различных клеточных систем к D₂O отличны. С точки зрения физиологии, наиболее чувствительными к замене H⁺ на D⁺ являются аппарат биосинтеза и дыхательная цепь, т.е. именно те клеточные системы, которые используют высокую подвижность протонов и высокую скорость разрыва водородных связей. Последний факт позволяет рассматривать адаптацию к D₂O как к неспецифическому фактору, действующему одновременно на функциональное состояние большого числа систем: метаболизм, пути ассимиляции углеродных субстратов, биосинтетические процессы, структуру и функции макромолекул.

Нам представляется целесообразным выбор микроорганизмов в качестве биомоделей в этих исследованиях, поскольку они очень хорошо адаптируются к внешним условиям и способны выдерживать высокие концентрации D₂O в ростовых средах.

Список литературы

1. **Денько Е.И.** Действие тяжелой воды (D₂O) на клетки животных, растений и микроорганизмы // Усп. совр. биол. 1970. Т. 70. № 4. 41 с.
2. **Ерёмин В.А., Чекулаева Л.Н.** Выращивание бактерий *Micrococcus lysodeikticus* на дейтерированной среде // Микробиология. 1978. Т. 14. С. 125-136.
3. **Кишенбаум И.** Тяжелая вода // В кн: Физические свойства и методы анализа: Пер. с англ. - М.: Атомиздат. 1953. 98 с.
4. **Лобышев В.Н., Калинин Л.П.** Изотопные эффекты D₂O в биологических системах. - М.: Наука. 1978. 215 с.
5. **Мосин О.В., Складнев Д.А., Швеиц В.И.** Включение дейтерированных ароматических аминокислот в молекулу бактериородопсина *Halobacterium halobium* // Прикл. биохим. Микробиол. 1999. Т. 35. № 1. С. 34-42.
6. **Мосин О.В., Складнев Д.А., Швеиц В.И.** Исследование физиологической адаптации бактерий на тяжёловодородной среде // Биотехнология. 1999. № 8. С. 16-23.
7. **Мосин О.В., Складнев Д.А., Швеиц В.И.** Методы получения белков и аминокислот, меченных стабильными изотопами 2H, 13C и 15N // Биотехнология. 1996. № 3. С. 12-32.
8. **Мосин О.В.** Дейтерий, тяжелая вода, эволюция и жизнь // Водоочистка, водоподготовка, водоснабжение. 2009. № 8. С. 64-70.

9. **Мосин О.В., Игнатов И.** Изотопные эффекты дейтерия в клетках бактерий и микроводорослей // Вода: химия и экология. 2012. № 3. С. 83-94.

10. **Мосин О.В., Казаринова Л.А., Преображенская К.А., Складнев Д.А., Чеботаев Д.В., Юркевич А.М., Швеиц В.И.** Рост бактерии *Bacillus subtilis* на высокодейтерированной среде // Биотехнология. 1996. № 4. С. 19-27.

11. **Мосин О.В., Складнев Д.А., Егорова Т.А., Швеиц В.И.** Масс-спектрометрическая оценка уровня включения 2H и 13C в молекулы аминокислот бактериальных объектов // Биорган. химия. 1996. Т. 22. № 10-11. С. 856-869.

12. **Мосин О.В., Складнев Д.А., Егорова Т.А., Юркевич А.М., Швеиц В.И.** Изучение биосинтеза аминокислот штаммом *Brevibacterium methylicum* при росте на средах, содержащих тяжелую воду и дейтерометанол // Биотехнология. 1996. № 3. С. 3-12.

13. **Складнев Д.А., Мосин О.В., Егорова Т.А., Ерёмин С.В., Швеиц В.И.** Метилотрофные бактерии – источники изотопномеченных 2H- и 13C-аминокислот // Биотехнология. 1996. № 5. С. 25-34.

14. **Стом Д.И., Пономарева А.Л., Вятчина О.Ф.** Влияние воды с измененным количеством дейтерия на красного калифорнийского гибрида (*Eusenia fetida* Andrei Bouche) // Бюлл. ВСНЦ СО РАН. 2006. Т. 6. № 52. С. 167-169.

15. **Cioni P., Strambini G.B.** Effect of Heavy Water on Protein Flexibility // Biophysical J. 2002. V. 82(6). P. 3246-3253.

16. **Cleland W.N., O'Leary M.H., Northrop D.D.** Isotope Effects on Enzyme-Catalyzed Reactions. - Baltimore, London, Tokyo: University Park Press. 1976. 303 p.

17. **Crespi H.L.** Fully deuterated microorganisms: tools in magnetic

resonance and neutron scattering. Synthesis and Applications of Isotopically Labeled Compounds // In: Proceedings of an International Symposium. Baillie T, Jones J.R eds. - Amsterdam: Elsevier. 1989. P. 329-332.

18. **Kushner D.J., Baker A., Dunstall T.G.** Pharmacological uses and perspectives of heavy water and deuterated compounds // Can. J. Physiol. Pharmacol. 1999. V. 77(2). P. 79-88.

19. **LeMaster D.M.** Uniform and selective deuteration in two-dimensional NMR studies of proteins // Ann. Rev. Biophys. Chem. 1990. V. 19. P. 243-266.

20. **Lis G., Wassenaar L.J., Hendry M.J.** High-Precision Laser Spectroscopy D/H and 18O/16O Measurements of Microliter Natural Water Samples // Anal. Chem. 2008. V. 80(1). P. 287-293.

21. **MacCarthy P.** Infrared spectroscopy of deuterated compounds: an undergraduate

experiment // J. Chem. Educ. 1985. V. 62(7). 633 p.

22. **Mosin O.V., Karnaukhova E.N., Pshenichnikova A.B., Reshetova O.S.** Electron impact mass-spectrometry in bioanalysis of stable isotope labeled bacteriorhodopsin // In: 6th Intern. Conf. on Retinal proteins. - Leiden, the Netherlands: Springer Verlag. 1994. 115 p.

23. **Mosin O.V., Skladnev D.A., Shvets V.I.** Biosynthesis of 2H-labeled phenylalanine by a new methylotrophic mutant *Brevibacterium methylicum* // Bioscience, biotechnology, and biochemistry. 1998. V. 62(2). P. 225-229.

24. **Vertes A.** Physiological effects of heavy water. Elements and isotopes: formation, transformation, distribution. - Dordrecht: Kluwer Acad. Publ. 2004. 112 p.

Studying of isotopic effects of heavy water (D₂O) in biological systems on example of prokaryotic and eukaryotic cells

O. V. Mosin, I. Ignatov

Isotope effects of deuterium (D) in cells of various taxonomic groups of prokaryotic and eucaryotic microorganisms realizing methylotrophical, chemoheterotrophical, photoorganotrophical, and photosynthetic ways of assimilation of carbon substrates (methylotrophic bacteria, halobacteria, green microalgae) are investigated at growth on media with heavy water (D₂O). The method of step by step adaptation technique of cells to D₂O is developed, consisting in plating of clls on 2% agarose nutrient media containing increasing gradient of concentration of D₂O (from 0 up to 98% D₂O) and the subsequent selection of stable to D₂O cells. Obtained from growth media with a low gradient of D₂O concentration, cells were further transferred on growth media with higher gradient of D₂O concentration, up to 98% D₂O. In the result of that technique it were obtained adapted to maximum concentration of D₂O cells, biological material of which instead of hydrogen contained deuterium with levels of enrichment 95% D. Usage of cells adapted to D₂O and deuterated natural compounds (protein, amino acids, nucleosides, pigments, carboxydrates, lipids), extracted from them, can find further application in biophysical researches and biomedical technologies.

Key words: deuterium, heavy water, adaptation, isotopic effects, bacteria, microalgae.

Структурная реорганизация бедренной и большеберцовой артерий, малоберцового нерва и хряща коленного сустава при экспериментальных переломах костей голени у собак и их лечении методом чрескостного остеосинтеза

Н.А. Щудло, Т.Н. Варсегова, Т.А. Ступина, И.В. Борисова

ФГБУ «РНЦ «ВТО» им. акад. Г. А. Илизарова Минздравсоцразвития России», г. Курган

Контактная информация: к.б.н. Варсегова Татьяна Николаевна varstn@mail.ru

У 18 взрослых беспородных собак моделировали оскольчатые переломы голени. Проведено комплексное гистологическое исследование с применением компьютерной морфометрии бедренных и передних большеберцовых артерий, поверхностного малоберцового нерва, хряща коленного сустава в разные сроки фиксации голени в аппарате Г.А. Илизарова (14, 21, 35-37 и 48-50 суток), через 30 и 90 суток после снятия аппарата (80 и 140 суток эксперимента, соответственно). Признаки механического повреждения передней большеберцовой артерии выявлены в 22,2% опытов, повреждения малоберцового нерва – в 11,1% случаев. Установлено, что динамика изменений среднего диаметра передней большеберцовой артерии оперированной конечности, диаметра просвета и толщины её стенки зависела от интенсивности остеогенеза. Увеличение абсолютной величины морфометрических показателей наблюдается у животных с ускоренной консолидацией перелома (35-37 суток), при фиксации в аппарате в течение 48-50 дней все морфометрические показатели имели тенденцию снижения по сравнению с периодом 14-21 дней фиксации. Увеличение калибра и просвета артерий сопровождалось формированием дефектов внутренней эластической мембраны, протяжённость которых в поперечных срезах превышала 30% периметра люминальной поверхности. В опытах с отсутствием признаков механического повреждения малоберцового нерва выявлены изменения эпинеурия и перинеурия, которые свидетельствуют об усилении структурно-функциональных характеристик перинеурального барьера и гистогенезе структур, обеспечивающих механическую прочность нерва и поддержание гомеостаза среды микроокружения нервных волокон. В суставном хряще выявлены деструктивные изменения, выражающиеся разволокнением межклеточного вещества поверхностной зоны, гибелью части хондроцитов, снижением толщины хряща и численной плотности хондроцитов. Вплоть до 140 суток опыта репаративная регенерация хряща имела незавершённый характер. Полученные экспериментальные данные необходимы для разработки эффективных методов поддерживающей терапии и функциональной реабилитации пострадавших с переломами костей.

Ключевые слова: переломы, ремоделирование артерий, регенерация нервов, хряща.

Введение

Переломы большеберцовой кости печально известны как повреждения, которые «нечасто отбирают жизнь, но часто её меняют» [17]. Анатомические особенности голени определяют высокую частоту открытых переломов, создающих риск инвалидизирующих осложнений. Ранний остеосинтез аппаратом

Г.А. Илизарова признаётся методом выбора в лечении этих переломов, поскольку он обеспечивает оптимальные условия для костного сращения и восстановления утраченных функций [5, 8, 19]. Однако функциональная реабилитация таких пострадавших относится к трудным проблемам травматологии.

Принято считать, что главная причина