

*М.Н.Копицына¹, А.С.Морозов^{1,2}, И.В.Бессонов^{1,2},
В.М.Писарев³, Е.С.Лобакова², О.В.Бухарин⁴*

ЛИГАНДЫ ДЛЯ СЕЛЕКТИВНОГО УДАЛЕНИЯ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ЭНДО- ТОКСИНОВ ГРАМОТРИЦАТЕЛЬНЫХ БАКТЕРИЙ

¹АО Перспективные медицинские технологии, Москва; ²Московский государственный университет им. М.В.Ломоносова; ³НИИ общей реаниматологии им. В.А.Неговского, Москва; ⁴Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза, Оренбург

Бактериальные липополисахариды (ЛПС) — высокотоксичные молекулы, выделяющиеся при лизисе бактериальных клеток. Они играют ключевую роль в патогенезе сепсиса, а также могут контаминировать лекарственные препараты, поэтому их удаление из водных растворов и биологических жидкостей — крайне важная задача. В настоящем обзоре рассмотрена структура ЛПС, его токсичность для различных животных, а также различные низко- и высокомолекулярные лиганды, пригодные для эффективного связывания и удаления ЛПС из растворов. Основное внимание уделено взаимосвязи химического строения лиганда с его способностью образовывать прочные комплексы с ЛПС и принципам создания селективных лигандов для депирогенизации фармацевтических субстанций и создания гемосорбционных колонок для терапии сепсиса.

Журн. микробиол., 2017, № 3, С. 115—126

Ключевые слова: липополисахарид, бактериальный эндотоксин, сепсис, гемосорбция, депирогенизация, селективный сорбент

*M.N.Kopitsyna¹, A.S.Morozov^{1,2}, I.V.Bessonov^{1,2},
V.M.Pisarev³, E.S.Lobakova², O.V.Bukharin⁴*

LIGANDS FOR SELECTIVE REMOVAL OF LIPOPOLYSACCHARIDES FROM GRAM NEGATIVE BACTERIA

¹JSC Advanced Medical Technologies, Moscow; ²Lomonosov Moscow State University; ³V.A.Negovsky Research Institute of General Reanimatology, Moscow; ⁴Institute of Cellular and Intracellular Symbiosis, Orenburg, Russia

Bacterial lipopolysaccharides (LPS) are highly toxic molecules released during the lysis of bacterial cells. They play important role in the pathogenesis of sepsis, and can contaminate pharmaceuticals, so removing them from aqueous solutions and biological fluids is an extremely important task. Structure of LPS and its toxicity for various animals are presented in this review. Various low- and high-molecular ligands, suitable for efficient binding and removal LPS from solutions are studied and demonstrated. The main attention is paid to the relationship between the chemical structure of the ligand and its ability to form strong complexes with LPS and the principles of creating selective ligands for the depyrogenation of pharmaceutical substances and the creation of hemoperfusion columns for the sepsis therapy.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2017, No. 3, P. 115—126

Key words: lipopolysaccharide, bacterial endotoxin, sepsis, hemoperfusion, depyrogenation, selective sorbent

Липополисахарид (ЛПС) грамотрицательных бактерий — фрагмент наружной мембраны клеточной стенки, является бактериальным эндотоксином (БЭ) — антигеном системы врожденного иммунитета млекопитающих [16, 24]. Хотя сам ЛПС химически инертен, при попадании в кровеносную систему при генерализованной бактериальной инфекции, он связывается с рецепторами и клетками

иммунной системы, регулирующими воспалительный ответ. При этом происходит избыточный выброс медиаторов воспаления (цитокинов), и развивается слишком сильный системный воспалительный ответ, характеризующийся повреждением эндотелия кровеносных сосудов, коагулопатией, гипоперфузией тканей, сердечно-сосудистой недостаточностью, полиорганной дисфункцией. Именно эта последовательность событий сегодня признается ключевым звеном патогенеза сепсиса, грозного осложнения бактериальных инфекций, ежегодно уносящего сотни тысяч жизней [9].

Химическое строение ЛПС придает им свойства поверхностно-активных веществ, поэтому в водных растворах и в биологических жидкостях, в частности, в крови, равновесие сдвинуто в сторону образования супрамолекулярных структур переменного состава и строения, в состав которых могут также входить белки плазмы крови и ионы металлов [32, 42]. В то же время, физиологической активностью ЛПС обладают в ничтожно низких концентрациях порядка 10^{-9} г/кг [42]. Эффективным методом, позволяющим добиться снижения их концентрации ниже физиологически значимых величин, является применение аффинных сорбентов на основе иммобилизованных лигандов, специфичных к ЛПС. При этом константа образования комплекса с иммобилизованным лигандом должна быть достаточно высока ($\sim 10^6 - 10^9$) [12]. Это позволяет сдвинуть равновесие сорбционного процесса в сторону образования иммобилизованных комплексов ЛПС с лигандом. Важно отметить, что неселективные сорбенты с развитой поверхностью, способные эффективно удалять малые молекулы, такие как активированный уголь, алюмосиликаты, полисахаридные гели и другие, зачастую не позволяют снизить концентрацию ЛПС до приемлемого уровня [31].

Экстракорпоральные методы детоксикации, направленные на извлечение из крови пациента БЭ, при своевременном применении обладают клинически доказанной эффективностью при лечении сепсиса и септического шока [3, 14]. Наиболее перспективной разновидностью экстракорпоральной детоксикации являются селективная ЛПС-гемосорбция. Ее принцип заключается в избирательном связывании (и направленном удалении) БЭ, первичного звена патогенеза сепсиса. Существуют также гемосорбенты, способные удалять одновременно как БЭ, так и эндогенные медиаторы воспаления — цитокины («мультимодалные» гемосорбенты) [3].

Другой важной задачей, решаемой с помощью подобных сорбентов, может стать проблема «депирогенизации» (удаления «пирогенных» примесей — чаще всего это те же самые ЛПС) лекарственных препаратов. Особенно остро эта проблема стоит для лекарств, получаемых биотехнологическим путем, продуцентами которых являются грамотрицательные бактерии. Универсального способа решения этой проблемы пока не найдено, но есть отдельные сообщения об эффективных идеях [2].

Для рационального дизайна таких умных материалов, избирательно поглощающих ЛПС из физиологических жидкостей, требуется глубокое понимание механизма связывания ЛПС с их лигандами. О принципах строения таких лигандов и пойдет речь в данном обзоре

1. *Структура и свойства бактериальных эндотоксинов.* БЭ являются неотъемлемой частью внешней мембраны грамотрицательных бактерий, они также участвуют в стабилизации клеточной стенки бактерий [26, 27]. Общая химическая структура ЛПС у большинства бактерий сходная. ЛПС содержит полярный гетерополисахаридный фрагмент (О-антиген), внутренний олигосахаридный и липидный (липид А) фрагменты [36, 50].

Фрагмент О-антигена состоит из повторяющихся сахаридных фрагментов и присутствует в эндотоксинах не всех грамотрицательных бактерий [26], в частности некоторые бактерии из рода *Neisseria* продуцируют ЛПС без О-антигенного фрагмента, при этом биологическая функция БЭ сохраняется [10]. В отличие от внутреннего полисахаридного фрагмента в О-антигене довольно часто присутствуют деоксисахара, при этом встречаются как линейные, так и сильно развет-

вленные полисахаридные фрагменты, функционолизированные различными агликонами, такими, как ацетилфосфат, фосфорилэтанолламин, формил, ацетамид, и аминокислотными остатками [6, 20]. В целом, О-антиген является наименее консервативным участком бактериальных ЛПС.

Внутренняя часть олигосахаридного фрагмента более консервативна и содержит семиуглеродные сахара гептозы (Hep) и, как минимум, один остаток 3-дезоксид-Д-манно-окт-2-улозоновой кислоты (Kdo). Фрагмент Kdo редко встречается в других гликанах, это означает, что его можно рассматривать в качестве маркера присутствия ЛПС [44]. Стоит отметить, что у некоторых жизнеспособных штаммов бактерий отсутствует как О-антиген, так и большая часть внутреннего олигосахарида, но фрагмент Kdo необходим для жизнеспособности бактерий. Если рассматривать содержание семиуглеродных сахаров, к примеру, в бактериях вида *Escherichia coli* и в других энтеробактериях, в зависимости от конкретного вида может быть два или три остатка Д-глицеро- α -Д-манно-гептопиранозы и L-глицеро- α -Д-манно-гептопиранозы.

Внутренний олигосахаридный фрагмент можно условно разделить на внутреннюю и внешнюю часть. Внешняя часть, также как и О-антиген, может сильно различаться у разных видов бактерий, и преимущественно содержит в своем составе остатки типичных шестиуглеродных сахаров, таких как глюкоза (Glc), глюкозамин (GlcN), ацетилглюкозамин (GlcNAc), в количестве от 8 до 12 сахаридных фрагментов. Эти сахара нередко модифицированы фосфатными, пирофосфатными и фосфорилэтанолламинными группами в 1 и 4 положениях [26].

Липид А — наиболее консервативная часть молекулы ЛПС, представляющая собой уникальный фосфорилированный гликолипид [49]. Все липиды А содержат Д-глюкозоаминные остатки (или 2,3-диамино-2,3-дидезокси-Д-глюкозу), которые присутствуют в виде β -(1 $\rightarrow$ 6) связанных димеров. Другими характерными особенностями липида А является наличие фосфатов в 1 и 4' положениях и (R)-

Токсичность БЭ для различных видов животных

Вид животного	ЛД ₅₀ , мг/кг	Продуцент БЭ, способ введения	Ссылка
Крупный рогатый скот	0,025 ¹	<i>E. coli</i> O78	[8]
Собаки	0,125—0,5 ²	<i>E. coli</i>	[38]
	4 ¹	<i>E. coli</i> O78	[8]
Кролики	3 ¹	<i>E. coli</i> O78	[8]
	>5	<i>Salmonella</i> spp.	[23]
		<i>Salmonella</i> spp.	[23]
Свиньи	0,5 ²		
	5 ¹	<i>E. coli</i> O78	[8]
	0,092 ³	<i>S. abortus equi</i>	[23]
Морские свинки	1 ⁴	<i>S. abortus equi</i>	[23]
	10 ¹	<i>E. coli</i> O78	[8]
Крысы	13—24,8	<i>E. coli</i> O128:B12	[11]
	20—60 ¹	<i>E. coli</i> O78	[8]
Мыши	0,25—0,40 мг/мышь	<i>S. typhimurium</i> Lt ₂	[23]
	0,38—0,43 мг/мышь	<i>S. typhimurium</i> Lt ₂	[23]
	0,34—0,36 мг/мышь ²	<i>S. typhimurium</i> rouB (R ₁₁)	[23]
	0,42—0,50 мг/мышь ²	<i>S. typhimurium</i> rouB (R ₁₁)	[23]
	25—60 ¹	<i>E. coli</i> O78	[8]
Кошки	15 ¹	<i>E. coli</i> O78	[8]
Макаки-резус	>25	<i>E. coli</i> , <i>S. typhosa</i>	[41]
Цыплята	>50	<i>E. coli</i> O78	[8]
Лягушки	>100	<i>E. coli</i> O78	[8]
Ящерецы	>200	<i>E. coli</i> O128:B12	[17]
Рыбы (капп)	>200	<i>E. coli</i> O78	[17]

Примечание. ¹Приведено значение летальной дозы, вероятно, имеется в виду ЛД₁₀₀; ²в.в. способ введения; ³рассчитано методом пробит-анализа по данным из статьи; ⁴ЛД₁₀₀.

3-гидрокси-жирных кислот в 2, 2', 3 и 3'-положениях сахаров, связанных амидными или же эфирными связями.

В зависимости от строения гексозаминов, степени фосфорилирования, присутствия заместителей в фосфатной группе, а также длины цепи и строения жирных кислот молекулы липида А могут различаться между собой для различных видов бактерий и даже для одного штамма при определенных условиях [37].

Наиболее изученная структура липида А *E. coli* содержит две фосфатные группы и шесть остатков жирных кислот (C12:0 и C14:0). Однако в особых условиях под действием ферментов фосфатные группы могут быть этерифицированы этаноламином, 4-амино-4-дезоксид-*L*-арабинозой или пальмитиновым спиртом [35]. В структуре липида А бактерии *Rhizobium etli* присутствует остаток длинноцепочечной жирной кислоты (C28:0) в положении 2', но отсутствуют фосфатные группы. В структуре липида А *Francisella tularensis* есть только одна фосфатная группа и четыре остатка жирных кислот (C16:0, C18:0). В липиде А *Salmonella typhimurium* имеется дополнительный остаток жирной кислоты в положении 2 (C16:0). Дополнительные к основному остову углеводные фрагменты были также обнаружены в составе липида А таких бактерий, как, например, *F. tularensis*, *S. typhimurium* и *R. etli*.

Таким образом, молекула ЛПС заряжена отрицательно (pK_a 1,3 [30]) при наличии фосфатных групп в липиде А и внутреннем сахаридном фрагменте и имеет как гидрофильные (О-антиген, так и гидрофобные (жирные кислоты в липиде А) участки. Молекулярная масса ЛПС варьируется в широких пределах от 2,5 кДа (в случае отсутствия О-антигена) до 70 кДа (очень большой О-антиген), обычно — от 10 до 20 кДа [10]. Молекула ЛПС является очень гибкой, значительно более гибкой, чем глобулярные белки [19].

Другой отличительной особенностью ЛПС является способность образовывать прочные супрамолекулярные структуры под действием гидрофобных взаимодействий между остатками жирных кислот и образований мостиков между фосфатными группами и двувалентными катионами, в частности, Ca^{2+} и Mg^{2+} [10].

2. *Токсичность бактериальных эндотоксинов.* Хотя БЭ прочно связаны с клеточной стенкой бактерий, они могут высвобождаться в окружающую среду не только при гибели клеток, но и во время их роста и деления [22], при этом одна бактериальная клетка может содержать приблизительно 2 миллиона молекул ЛПС [49]. Поэтому БЭ обнаруживаются во всех средах, где обнаруживаются грамотрицательные бактерии. Особенно высокие концентрации БЭ наблюдаются при массовой гибели бактерий в очаге инфекции и в средах биотехнологических производств [10].

Остро стоит проблема очистки фармацевтических препаратов, предназначенных для парентерального введения [26]. Безопасным считается введение БЭ в дозе не более 5 ЕЭ/кг/ч (1 ЕЭ=100 пг БЭ) [1]. Наиболее часто БЭ могут содержаться в рекомбинантных белках, получаемых генно-инженерным путем, ведь продуцентом зачастую являются грамотрицательные бактерии. Очистка таких препаратов — важная и зачастую не простая задача [26].

БЭ весьма токсичны при попадании в кровь, причем разные виды животных имеют не одинаковую чувствительность к БЭ (табл.; данные LD_{50} приведены для интраперитонеального введения вещества, если не сказано отдельно).

Исходя из данных, представленных в табл., можно сделать вывод, что разные животные имеют различную чувствительность к БЭ. Рыбы, пресмыкающиеся, земноводные, цыплята и макаки не погибают даже при введении очень высоких доз БЭ, хотя у цыплят и макак отмечаются симптомы заболевания. Мыши, крысы, морские свинки, свиньи, кролики и собаки имеют умеренную восприимчивость к ЛПС, в то же время, для крупного рогатого скота БЭ является чрезвычайно токсичным веществом со смертельной дозой 0,025 мг/кг. Также следует отметить, что для собак при в/в введении смертельная доза на порядок ниже, чем при интраперитонеальном.

Наиболее частыми симптомами при отравлении БЭ у животных являются лихорадка, диарея, малоподвижность, тахикардия, учащенное дыхание, цианоз. Для кошек также наблюдалось агрессивное поведение и рвота через 1 — 2 ч после введения ЛПС. У кошек и собак развивался понос с кровью, у мышей — паралич. У различных животных также наблюдались отеки и геморрагии в сочетании с шоковым состоянием. У восприимчивых к БЭ животных наибольшие изменения отмечены в желудочно-кишечном тракте. У крыс и собак кровотечения отмечаются преимущественно в лимфатической системе, а также в тимусе и бляшках Пейера. У собак иногда наблюдаются кровотечения в селезенке. У свиней и кошек кровотечения возникают в эпикарде и эндокарде, также иногда отмечается отек легких [8].

Для человека БЭ представляют не меньшую опасность. Так, введение БЭ в дозе 0,0025 мкг/кг вызывает повышение температуры [39]. В больших дозах (от 0,02 до 0,04 мкг/кг) отмечается заметный токсический эффект, во многом напоминающий клинику септического шока [46]. Описан клинический случай в/в введения БЭ (*E. coli* O127:B8) в дозе 2 мкг. После введения отмечалась лихорадка, озноб, понижение АД, что потребовало лечения в отделении интенсивной терапии в течение 8 ч [40].

БЭ играют непосредственную роль в развитии клинической картины тяжелого сепсиса и септического шока [45]. Поэтому на удалении БЭ основаны современные высокоэффективные методы терапии сепсиса [4].

3. *Создание селективных лигандов для удаления бактериальных эндотоксинов.* Из-за вариативности химических структур БЭ, выражающихся в различных модификациях О-антигена и внутреннего олигосахарида, лиганд должен характеризоваться максимальным связыванием с самой консервативной частью БЭ — липидом А. Применение специально подобранных лигандов для создания гемосорбентов позволяет проводить селективное удаление токсикантов (БЭ) из крови и различных растворов.

Как было сказано выше, липид А, а также внутренний олигосахаридный фрагмент, входящие в состав БЭ, фосфорилированы, чем обусловлен отрицательный заряд БЭ при обычных условиях (pK_a 1.3) [6, 19]. Можно предположить, что для лучшего связывания эндотоксина необходим лиганд, обладающий положительным зарядом, носителем которого обычно выступают положительно заряженные протонированные аминогруппы. Ниже приведен подробный анализ молекул, используемых для удаления БЭ.

3.1 *Полимиксин В.* Полимиксин В — это своеобразный «золотой стандарт» среди лигандов, взаимодействующих с ЛПС. В структуре полимиксинов можно выделить гидрофобную область, состоящую из остатков жирных кислот и аминокислот, а также полярную часть, несущую положительный заряд [16, 28]. Полимиксин В используется в колонках ToxaymixinTM в качестве лиганда для удаления ЛПС [13, 43].

Бактерицидная активность полимиксина В в отношении грамотрицательных бактерий обусловлена его способностью встраиваться и разрушать клеточную стенку бактерий, взаимодействуя с ЛПС. Изучению взаимодействия полимиксина В с БЭ посвящено много работ [5, 18, 34].

Mares J. et al. проводили изучение структуры комплекса, образующегося в результате взаимодействия нескольких типов полимиксинов с ЛПС [28]. Методами ЯМР-спектроскопии было показано, что амидные фрагменты пептидного макроцикла образуют связи с фосфатной группой GlcN-B в липиде-А. Гидрофобные фрагменты D-Phe and Leu оказываются в непосредственной близости от жирно-кислотных остатков ЛПС, при этом Leu дополнительно связывается с фрагментом GlcN-B. Аминогруппы из Dab вступают в электростатические взаимодействия с фосфатным фрагментом GlcN-A, а также с карбоксильной группой в Kdo-C. Таким образом, комплекс ЛПС-полимиксин В возникает за счет связывания с фрагментом GlcN-B, соседних с ними атомов из GlcN-A, и функциональ-

ными группами в Kdo-C. Структура этого комплекса подтверждается данными химических сдвигов и межмолекулярным ядерным эффектом Оверхаузера [43].

Многие научные группы проводили аналогичные эксперименты по определению взаимодействия полимиксина В с ЛПС. Так, было показано, что связывание происходит благодаря взаимодействию гидрофобной части пептида в полимиксине В с липидом А [47, 48], однако кинетика связывания такого комплекса достаточно медленная, и время контакта, необходимое для реакции, составило 16 часов при экспериментах в статичных режимах.

Несмотря на чрезвычайно высокие показатели по адсорбции БЭ, сорбенты на основе полимиксина В обладают рядом существенных недостатков. Основная проблема — нейротоксичность и нефротоксичность полимиксина В в случае смыывания с полимерной матрицы [15, 33]. Также при пропускании растворов через колонки с полимиксином В наблюдалась существенная адсорбция белков, таких как бычья каталаза (24%) [21] и бычий сывороточный альбумин (20%) [7]. Удерживание белков на колонке с полимиксином В обусловлено электростатическим взаимодействием между положительно заряженным лигандом и отрицательно заряженными белками при низкой ионной силе.

3.2 Гистамин и гистидин. Уже в 1982 г. японские ученые показали, что помимо азотистых оснований (аденина, цитозина и др.) гистидин и гистамин эффективно удаляют ЛПС из различных культур микроорганизмов [29]. По эффективности использования в качестве лигандов для извлечения БЭ гистидин и гистамин не уступают полимиксину В при очистке растворов таких белков, как альбумин, инсулин, лизоцим и миоглобин. Несмотря на то, что оба этих лиганда могут эффективно связываться с ЛПС, предпочтение было отдано гистидину, так как он не обладает такой биологической активностью, как гистамин, а потому является более безопасным.

Как и в случае с полимиксином В, при оценке эффективности адсорбции важно учитывать селективность удаления БЭ. Присутствие в растворе белков существенно влияет на способность лигандов к селективной сорбции ЛПС из-за высокой степени извлечения белковых компонентов [7, 25]. Эффективность гистидина в качестве лиганда обусловлена гидрофобными и электростатическими взаимодействиями, возникающими за счет положительного заряженного имидазольного фрагмента в молекуле, а также, заряженных аминокислотных групп [34]. При этом опубликованы данные, подтверждающие эффективность самого диаминогексана в качестве агента для извлечения БЭ из растворов [Hou K.C. et al., 1991]. При использовании гистидина в комплексе с незаряженным спейсером на основе диоксиранов эффективного извлечения ЛПС удалось добиться только в кислой среде при $pH \leq 5,5$, когда на имидазольном кольце присутствует положительный заряд (pK имидазола 6,0).

3.3 Поликатионные лиганды. Для селективного извлечения БЭ из водных растворов, а также из плазмы крови применяются разнообразные поликатионные лиганды. Большое количество модификаций таких лигандов для связывания БЭ свидетельствует о том, что точное структурное соответствие между молекулами лиганда и БЭ не является необходимым. Главным условием для создания селективного лиганда является наличие поликатионной молекулы с гидрофобными областями [Takahashi I. et al., 1987].

Среди поликатионных лигандов наиболее популярным соединением является полиэтиленимин — разветвленный полимер весом порядка 60 кДа, содержащий в своем составе первичные, вторичные и третичные аминокислотные группы в соотношении 1:2:1. При нейтральных условиях полиэтиленимин заряжен положительно ($pK > 9$ у первичных аминокислотных групп и $pK > 0,5$ у вторичных аминокислотных групп); а БЭ в аналогичных условиях обладают отрицательным зарядом за счет фосфатных групп, входящих в состав липида А [18]. Таким образом, связывание происходит благодаря электростатическим взаимодействиям. Кроме того, после сближения молекул полиэтиленимина и БЭ за счет электростатических взаимодействий возникают дополни-

тельные силы притяжения между гидрофобными фрагментами благодаря близкому расположению последних.

Полиэтиленимин, иммобилизованный на целлюлозной подложке, был успешно протестирован при экстракорпоральном извлечении БЭ из плазмы [Mitzner S. et al., 1993]. Показано, что эффективность сорбции сравнима с действием полимиксина В, а биосовместимость таких сорбентов — выше. При извлечении ЛПС из раствора бычьего сывороточного альбумина, полиэтиленимины на целлюлозных волокнах адсорбировали БЭ эффективнее, чем соответствующие сорбенты с гистидином, и не так сильно зависели от ионной силы и рН исследуемых растворов [Morimoto S. et al., 1995]. Растворы миоглобина, γ -глобулина и цитохрома С были очищены от БЭ в циклическом режиме (эффективность — 98%, концентрация оставшегося в растворе БЭ $< 0,05$ нг/мл), при этом степень извлечения белка не превышала 2%.

В качестве подложки также могут применяться пористые частицы оксида циркония. Сорбенты на основе полиэтилениминов, иммобилизованных на оксиде циркония, стабильны даже в щелочных условиях и обладают достаточно высокой емкостью по эндотоксину (снижение концентрации БЭ с $5 \cdot 10^6$ ЕЭ/мл до 5 ЕЭ/мл).

Поли-L-лизин является более гидрофобным из-за наличия в структуре алкильных цепей и также успешно применяется для извлечения БЭ из растворов БСА. Его эффективность не уступает полимиксину В или гистамину и гистидину, причем селективность по отношению к белку выше [7].

Известны работы, подтверждающие, что хитозан — катионный полиэлектролит, представляющий собой линейный полисахарид, построенный из β -1,4-глюкозааминовых остатков, взаимодействует с ЛПС с образованием стабильных растворимых комплексов разного состава благодаря заряженным аминокетогруппам [Naberezhnykh G.A. et al., 2013].

Взаимодействие БЭ с поликатионами вероятнее всего основывается на том же принципе, что и флокуляция клеток. При флокуляции в начале образуются полианионные-поликатионные комплексы. После этого молекулы воды замещаются и образуются агрегаты больших размеров — процесс, получивший название комплексная коацервация [Xia J. et al., 1994]. Если представить, что такой же процесс происходит при взаимодействии БЭ и поликатионов, то можно предположить, что образующиеся комплексы непрерывно выделяются из растворов. Это могло бы объяснить наличие отдельных областей связывания, которые наблюдаются при термодинамических исследованиях, а также селективность поликатионных лигандов в присутствии белков.

3.4 Лиганды на основе белковых молекул. Некоторые белки также могут взаимодействовать с БЭ. В их числе можно выделить ЛПС-связывающий белок, бактерицидный белок, увеличивающий проницаемость клеточной мембраны, компонент амилоида Р и некоторые другие [6].

Катионные амфифильные белки, составляющие основную часть антимикробных агентов, связываются с ЛПС не хуже, чем полимиксин В. На крысах было показано, что белок кателицидин LL-37 нейтрализует биологическую активность БЭ и может спасти от летального исхода при высоких содержаниях БЭ в крови. Однако в присутствии двухвалентных катионов или при относительно высоких концентрациях других электролитов активность катионных амфифильных белков снижается. Учитывая эти особенности, был синтезирован искусственный белок WLBU2, синтетический аналог LL-37. Такой белок активно связывается и вызывает агрегацию БЭ при физиологических концентрациях NaCl в растворах, а также проявляет более высокую антимикробную активность по сравнению с полимиксином В или LL-37 в отношении широкого спектра бактерий [Ryder M.P. et al., 2014].

В имеющихся на рынке колонках Endotrap применяется сорбент на основе ЛПС-специфичного белка, полученного из бактериофага, иммобилизованного

на агарозную матрицу. Такие системы селективны по отношению к БЭ, обладают высокой адсорбционной эффективностью и стабильностью в широком диапазоне pH от 5 до 10. Применяющаяся на сегодняшний день колонка для экстракорпоральной детоксикации крови при сепсисе Altесо представляет собой пористую полиэтиленовую матрицу, которая покрыта специально сконструированным синтетическим катионным пептидом, разработанным для адсорбции БЭ. Матрица также специально разработана для обеспечения оптимальной поверхности связывания. Такая конструкция сорбента сводит к минимуму нежелательные эффекты, оказываемые на клетки крови, при этом сохраняется максимальная поверхность и количество сайтов связывания пептида с БЭ. Благодаря высокому сродству сорбента к липиду А достигается эффективное снижение уровня БЭ различных видов бактерий [Adamik B. et al., 2015].

3.5 Дендримерные лиганды. Исходя из ранее сделанных выводов о том, какая должна быть структура ЛПС-селективного лиганда, можно предположить, что дендримерные молекулы полиамидоаминного типа должны эффективно удалять БЭ из растворов. Однако несмотря на то, что формально дендримеры типа А можно считать амфифильными за счет присутствия и неполярных, и положительно заряженных функциональных групп, взаимодействия с БЭ не происходит.

Это объясняется тем, что большие дендримерные молекулы легко сворачиваются в «клубки», в результате чего гидрофобные фрагменты оказываются внутри, а на поверхности остаются заряженные аминогруппы, взаимодействующие с растворителями. Таким образом, в разбавленных растворах поведение таких молекул сходно с полиэлектролитами, а не с катионными амфифильными полимерами, так как гидрофобные области недоступны для контакта. Среди более 50 изученных видов различных дендримерных поликатионов, только один класс — монодендроны додециламина с четырьмя или восемью зарядами связываются с липидом А и адсорбируют БЭ [16].

3.6 Производные гуанидина, бигуанида и алифатических аминов. Ряд катионных амфифильных лекарств, применяющихся в клинической практике, также были исследованы на предмет связывания с липидом А и нейтрализации ЛПС. Среди них препараты против малярии на основе 4-аминохинолинов, нейролептики фенотиазины, производные бис- и бигуанидинов, хлоргексидин, пентамидин и др. Критерием при выборе именно таких препаратов служил их катионный амфифильный характер [David S.A. et al., 1994]. Из проводимых ранее исследований известно, что пентамидин и хлоргексидин взаимодействуют с липидом А, с константой связывания K_d 0,12 и 0,87 μM соответственно. Стоит отметить, что соответствующая K_d для полимиксина В составляет 0,37 μM . Бисбигуанидин и хлоргексидин связываются с липидом А на 1 — 2 порядка лучше, чем соответствующие монобигуанидины: метформин и фенформин.

Оба этих соединения эффективно блокировали активность ЛПС по данным гель-тромб ЛАЛ (Limulus amoebocyte lysate) теста. Это одно из первых подтверждений о том, что присутствие двух основных групп на некотором расстоянии в молекуле может коррелировать с высокой способностью связывания ЛПС. Как в пентамидине, так и в хлоргексидине присутствуют два идентичных фрагмента — производные гуанидина. В связи с этим особый интерес представляет варьирование основности этих фрагментов (pK) и расстояния между ними с точки зрения оценки эффективности комплексообразования с БЭ [Escamilla G.H., 1994]. Было показано, что введение метокси группы в орто-положение по отношению к амидиниевой группе в бензольном кольце уменьшает основность последней, но практически не влияет на связывания с ЛПС. Все рассмотренные аналоги пентамидина обладают практически одинаковой способностью к образованию комплекса с липидом А, из чего следует вывод, что основность не является определяющим фактором при оценке способности к комплексообразованию. Электростатические взаимодействия катионных лигандов с липидом А протекают с образованием ионных Н-связей («солевых мостиков»), так как было показано,

что некоторые соединения с кватернизованными полиамидиниевыми функциональными группами не связываются с БЭ [Rietschel E.T. et al., 1993].

α , ω — Диаминоалканы, полиамины спермидин и спермин и их производные, представляющие собой линейные молекулы, с расстоянием между аминогруппами от 5 до 16 Å, использовались для анализа. Оптимальное расстояние между основными группами для хорошего связывания с БЭ составило 16 Å (спермин), чуть хуже показывает себя спермидин — 11 Å.

Было показано, что гомологизованный спермин, в котором расстояние между аминогруппами соответствует исходному спермину и составляет 16 Å, более активен, чем моноацилированный спермин, что подтверждает предположение о важности расстояния между основными аминогруппами. Стоит отметить, что благодаря алкильной группе на конце молекулы соединения В его константа связывания в 5 раз лучше, чем у липополиаминов с гидрофобными заместителями, находящимися не на конце молекулы, такими, как DOSPER.

Показана эффективность микросфер на основе макропористых производных поли-(γ -алкил-L-глутамата) и их производных с введенными первичными аминогруппами для селективного удаления ЛПС из водных растворов, а также для очистки вакцин против дифтерии и столбняка [Hirayama S. et al., 1990]. Афинность таких микросфер по отношению к БЭ обусловлена катионными и слабыми гидрофобными свойствами микросфер на основе алкилглутаматов. Предположение об ионных взаимодействиях подтверждалось тем фактом, что адсорбционная способность таких сорбентов возрастала с увеличением количества введенных аминогрупп и значительно уменьшалась при высоких значениях ионной силы (I~1) растворов. Что касается гидрофобных взаимодействий, в пользу этого предположения свидетельствует тот факт, что даже не содержащие аминогрупп соединения могут связываться с ЛПС лучше, чем некоторые коммерчески доступные микросферы, в частности Ryogoser.

3.7 Молекулярный импринтинг. Сравнительно новая техника молекулярного импринтинга, получившая широкое распространение в последние годы, основывается на получении функциональных полимерных матриц при помощи специальных молекул-темплатов, которые образуют в матрицах так называемые «отпечатки» или полости [Cutivet A. et al., 2009]. Это позволяет получать полимеры, которые обладают ярко выраженным сродством к тем или иным биомолекулам, что, в свою очередь, открывает возможности использования таких матриц для разделения, очистки или идентификации биомолекул.

Подход, основанный на методе молекулярного импринтинга, позволяет создавать функциональные полимеры, связывающие ЛПС. Так, в работе [Long Y. et al., 2016] методом эмульсионной полимеризации были получены наночастицы, обладающие сильной афинностью по отношению к бактериям семейства *Pseudomonadaceae*. Для синтеза таких полимерных наночастиц с «молекулярными отпечатками» в качестве темплата использовался ЛПС, выделенный из бактерий *P. aeruginosa*.

Принцип работы таких наночастиц заключается в том, что при проведении микроэмульсионной полимеризации к раствору мономеров добавляется БЭ, выступающий в роли темплата. Молекулы мономера располагаются определенным образом вокруг него, после чего проводится синтез наночастиц. На последнем этапе происходит удаление ЛПС из продукта, в результате чего на том месте, где был введен ЛПС, в полимере остаются так называемые «полости», идеально подходящие по размеру к молекуле ЛПС.

Методом флуоресцентной поляризации, а также микромасштабного терморефа было продемонстрировано специфическое связывание таких частиц с ЛПС. Также было показано на моделях кератита у кроликов и менингита у мышей, вызванных *P. aeruginosa*, что наночастицы избирательно взаимодействовали с поверхностью бактериальных клеток.

Таким образом было продемонстрировано, что полученные методом молеку-

лярного импринтинга наночастицы могут обладать высокой аффинностью по отношению к ЛПС и грамотрицательным бактериям, это открывает новые пути для получения сорбентов селективных для удаления БЭ.

Наиболее эффективным, производительным и надежным методом удаления токсичных ЛПС из растворов, применяемым как в лабораториях, так и в клинической практике, является использование аффинных сорбентов. Несмотря на высокую вариабельность структуры ЛПС различных бактерий, домен липид А, содержащий две фосфорильные группы и фрагмент липида, является консервативным, и может рассматриваться в качестве молекулярной мишени для связывания самых разных ЛПС.

На протяжении уже нескольких десятилетий «золотым стандартом» в качестве лиганда для липида А рассматривается олигопептид полимиксин В, в состав которого входит пять остатков лизина и гидрофобный алкильный заместитель. Изучение трехмерной структуры прочного комплекса ЛПС и полимиксина В с помощью современных физико-химических методов позволило подтвердить ключевую роль в его формировании электростатических взаимодействий аминокислотных групп лиганда и фосфатных групп липида А, а также вспомогательную роль гидрофобных взаимодействий соответствующих алкильных заместителей.

Это позволило сделать ключевые выводы, сформулировать основные принципы создания синтетических лигандов для связывания липида А: таким лигандом должно являться амфифильное органическое соединение, содержащее две аминокислотные группы на расстоянии $\sim 15 \text{ \AA}$ друг от друга и гидрофобный алкильный заместитель. Критичным является именно наличие аминокислотных групп, роль алкильного заместителя является вспомогательной. Многие эффективные лиганды вообще не содержат подобных гидрофобных структурных фрагментов. Следует также не забывать о том, что наиболее эффективные лиганды в этом ряду (содержащие алкильный заместитель) являются цитотоксичными катионными поверхностно-активными веществами.

Таким образом, в зависимости от условий проведения сорбции, желаемой степени очистки раствора и дополнительных требований к процессу (например, био- и гемосовместимость сорбента, для возможности его применения в гемосорбционных колонках), аффинный сорбент может быть получен на основе самых необычных комбинаций матриц и лигандов, общие принципы создания которых мы постарались описать.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 16-14-00112).

ЛИТЕРАТУРА

1. Государственная фармакопея Российской Федерации. XII издание. Ч. 1. гл. 27 Бактериальные эндотоксины (ОФС 42-0062-07). М.: научный центр экспертизы средств медицинского применения. 2007: с. 128-136.
2. Красоткина Ю.В., Кустова П.А., Бессонов И.В., Морозов А.С., Копицына М.Н., Карелина Н.В., Нуждина А.В. «Эндосорб» — новый эффективный сорбент для очистки растворов фармацевтических белков от эндотоксинов. V съезд биофизиков России. Ростов-на-Дону; 2015: с. 208.
3. Морозов А.С., Бессонов И.В., Нуждина А.В., Писарев В.М. Сорбенты для экстракорпорального удаления токсических веществ и молекул с нежелательной биологической активностью (обзор). Общая реаниматология. 2016, 12 (6): 82-107.
4. Anisimova N.Yu. Immunological pathogenesis of sepsis and use of hemosorption for treatment of cancer patients with sepsis. New York: Nova Science Publishers Inc, 2014: p. 57-114.
5. Anspach F. B. Membrane adsorbers for selective endotoxin removal from protein solutions. Process Biochemistry. 2000, 35: 1005-1012.
6. Anspach F.B. Endotoxin removal by affinity sorbents. J. Biochem. Biophys. Methods. 2001, 49 (1-3): 665-681.

7. Anspach F.B., Hilbeck O. Removal of endotoxins by affinity sorbents. *J. Chromatogr. A.* 1995, 711 (1): 81-92.
8. Berczi I., Bertok L., Bereznai T. Comparative studies on the toxicity of *Escherichia coli* lipopolysaccharide endotoxin in various animal species. *Can. J. Microbiol.* 1966, 12 (5): 1070-1071.
9. Bone R.C. Gram-negative sepsis: a dilemma of modern medicine. *Clin. Microbiol. Rev.* 1993, 6 (1): 57-68.
10. Caroff M., Karibian D. Structure of bacterial lipopolysaccharides. *Carbohydr. Res.* 2003, 338 (23): 2431-2447.
11. Clark I.A. Correlation between susceptibility to malaria and babesia parasites and to endotoxicity. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 1982, 76 (1): 4-7.
12. Copeland S., Warren H.S., Lowry S.F. et al. Inflammation and the host response to injury investigators. Acute inflammatory response to endotoxin in mice and humans. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 2005, 12 (1): 60-67.
13. Cruz D.N., Antonelli M., Fumagalli R. et al. Early use of polymyxin b hemoperfusion in abdominal septic shock. *JAMA.* 2009, 301 (23): 2445-2452.
14. Cutuli S.L., Artigas A., Fumagalli R. et al. EUPHAS 2 Collaborative Group. Polymyxin-B hemoperfusion in septic patients: analysis of a multicenter registry. *Ann. Intensive Care.* 2016, 6 (1): 77.
15. Damais C., Jupin C., Parant M., Chedid L. Induction of human interleukin-1 production by polymyxin B. *J. Immunol. Methods.* 1987, 101 (1): 51-56.
16. David S.A. Towards a rational development of anti-endotoxin agents: novel approaches to sequestration of bacterial endotoxins with small molecules. *J. Mol. Recognit.* 2001, 14 (6): 370-387.
17. Goodwin M.H., Stapleton T.K. The course of natural and induced infections of *Plasmodium joyrides* in *Sceloporus undulatus undulatus*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1952, 1 (5): 773-783.
18. Hanora A., Plieva F.M., Hedström M. et al. Capture of bacterial endotoxins using a supermacroporous monolithic matrix with immobilized polyethyleneimine, lysozyme or polymyxin B. *J. Biotechnol.* 2005, 118 (4): 421-433.
19. Hou K.C., Zaniewski R. Depyrogenation by endotoxin removal with positively charged depth filter cartridge. *J. Parenter. Sci. Technol.* 1990, 44(4): 204-209.
20. Jansson P.-E. The chemistry of O-polysaccharide chains in bacterial lipopolysaccharides. In: Brade H. et al. (eds.). *Endotoxin in health and disease*. New York: Medical Directions Incorporation; 1999: p. 155-178.
21. Karplus T.E., Ulevitch R.J., Wilson C.B. A new method for reduction of endotoxin contaminations from protein solutions. *J. Immunol. Methods.* 1987, 105 (2): 211-220.
22. Kastowsky M., Gutberlet T., Bradaczek H. Molecular modelling of the three-dimensional structure and conformational flexibility of bacterial lipopolysaccharide. *J. Bacteriol.* 1992, 174 (14): 4798-4806.
23. Kim Y.B., Watson D.W. Role of antibodies in reactions to gram-negative bacterial endotoxins. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1966, 133 (2): 727-745.
24. Kumar A. An alternate pathophysiologic paradigm of sepsis and septic shock. *Virulence.* 2014, 5 (1): 80-97.
25. Legallais C., Anspach F.B., Bueno S.M.A. et al. Strategies for the depyrogenation of contaminated IgG solutions by histidine-immobilized hollow fiber membrane. *J. Chromatogr. B. Biomed. Sci Appl.* 1997, 691 (1): 33-41.
26. Magalhães P.O., Lopes A.M., Mazzola P.G. et al. Methods of endotoxin removal from biological preparations: a review. *J. Pharm. Pharm. Sci.* 2007, 10 (3): 388-404.
27. Malik D.J., Webb C., Holdich R.G. et al. Synthesis and characterization of size-selective nanoporous polymeric adsorbents for blood purification. *Sep. Purif. Technol.* 2009, 66 (3): 578-585.
28. Mares J., Kumaran S., Gobbo M., Zerbo O. Interactions of lipopolysaccharide and polymyxin studied by NMR spectroscopy. *J. Biol. Chem.* 2009, 284 (17): 11498-11506.
29. Minobe S., Watanabe T., Sato T. et al. Preparation of adsorbents for pyrogen adsorption. *J. Chromatogr.* 1982, 248: 401-408.
30. Moran A.P., Rietschel E.T., Kosunen T.U., Zahring U. Chemical characterization of *Campylobacter jejuni* lipopolysaccharides containing N-acetylneuraminic acid and 2,3-diamino-2,3-dideoxy-D-glucose. *J. Bacteriol.* 1991, 173 (2): 618-626.

31. Morozov A.S., Kopitsyna M.N., Bessonov I.V. et al. A selective sorbent for removing bacterial endotoxins from blood. *Russ. J. Phys. Chem. A* 2016, 90 (12): 2465-2470.
32. Mueller M., Lindner B., Kusumoto S. et al. Aggregates are the biologically active units of endotoxin. *J. Biol. Chem.* 2004, 279 (25): 26307-26313.
33. Newton B.A. The properties and mode of action of the polymyxins. *Bacteriol. Rev.* 1956, 20 (1): 14-27.
34. Petsch D., Beeskow T.C., Anspach F.B., Deckwer W.-D. Membrane adsorbers for selective removal of bacterial endotoxin. *J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. Appl.* 1997, 693 (1): 79-91.
35. Raetz C.R., Whitfield C. Lipopolysaccharide endotoxins. *Annu. Rev. Biochem.* 2002, 71: 635-700.
36. Raetz C.R.H. Biochemistry of endotoxins. *Annu. Rev. Biochem.* 1990, 59: 129-170.
37. Raetz C.R.H. *Escherichia coli* and *Salmonella*. In: Niedhardt F.C. et al. (eds). *Cellular and molecular biology*. Washington, D.C.: American Society for Microbiology; 1996, p. 1035-1063.
38. Reddin J.L., Starzecki B., Spink W.W. Comparative hemodynamic and humoral responses of puppies and adult dogs to endotoxin. *Am. J. Physiol.* 1966, 210 (3): 540-544.
39. Rubenstein M., Mulholland J.H., Jeffery G.M., Wolff S.M. Malaria induced endotoxin tolerance. *Exp. Biol. Med.* (Maywood). 1965, 118 (1): 283-287.
40. Sauter C., Wolfensberger C. Interferon in human serum after injection of endotoxin. *Lancet.* 1980, 316(8199): 852-853.
41. Schmidt L.H. *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* infections in the owl monkey (*Aotus trivirgatus*) 1. The courses of untreated infections. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1978, 27(4): 671-702.
42. Seydel U., Brandenburg K., Koch M.H., Rietschel E.T. Supramolecular structure of lipopolysaccharide and free lipid A under physiological conditions as determined by synchrotron small-angle X-ray diffraction. *Eur. J. Biochem.* 1989, 186 (1-2): 325-332.
43. Shoji H. Extracorporeal endotoxin removal for the treatment of sepsis: endotoxin adsorption cartridge (Toraymyxin). *Ther. Apher. Dial.* 2003, 7: 108-114.
44. Silipo A., Molinaro A. Lipid A structure. In: Knirel Y. A., Valvano M. A. (eds.). *Bacterial lipopolysaccharides. Structure, chemical, synthesis, biogenesis and interaction with host cells*. N.Y.: Springer; 2011, p. 1-20.
45. Silverman M.H., Ostro J. Bacterial endotoxin in human disease. How advances in understanding the role of Gram-negative bacteria and endotoxin in infectious diseases and complications may improve the development of diagnostic and treatment options. Berkeley: XOMA LLC; 1999: 1-30.
46. Smith C.E. Bacterial and Mycotic Infections of Man. *Am. J. Public. Health.* 1953, 43 (10): 1344-1345.
47. Srimal S., Surolia N., Balasubramanian S., Surolia A. Titration calorimetric studies to elucidate the specificity of the interaction of polymyxin B with lipopolysaccharides and lipid A. *Biochem. J.* 1996, 315: 679-686.
48. Talmadge K.W., Siebert C.J. Efficient endotoxin removal with a new sanitizable affinity column: affi-prep polymyxin. *J. Chromatogr.* 1989, 476: 175-185.
49. Vaara M., Nikaido H. Outer membrane organization. In: Rietschel E. T. (ed.). *Handbook of Endotoxin*. Amsterdam: Elsevier; 1984: p. 1-45.
50. Wilkinson S.G. Bacterial lipopolysaccharides — themes and variations. *Prog. Lipid Res.* 1996, 35 (3): 283-343.

Поступила 17.02.17

Контактная информация: Морозов А.С.,
119234, Москва, Ленинские горы, 1, стр. 1, р.т. (495)939-27-76