

УДК 616.157-078

НОВЫЙ СОРБЕНТ НА ОСНОВЕ КОВАЛЕНТНО ИММОБИЛИЗОВАННОГО ЛИЗОЦИМА ДЛЯ УДАЛЕНИЯ БАКТЕРИАЛЬНОГО ЛИПОПОЛИСАХАРИДА (ЭНДОТОКСИНА) ИЗ БИОЛОГИЧЕСКИХ ЖИДКОСТЕЙ*

© 2019 П.А. Левашов^{1,2**}, Д.А. Матольгина^{1,2}, Е.Д. Овчинникова³,
И.Ю. Адамова⁴, О.А. Дмитриева³, А.В. Нуждина²,
Н.С. Покровский^{2,5}, Н.Л. Еремеев¹

¹ Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова,
химический факультет, 119234 Москва, Россия;
электронная почта: levashov@yahoo.com

² Московский государственный технический университет им. Н.Э. Баумана,
Межотраслевой инженеринговый центр композиционных материалов,
105005 Москва, Россия

³ Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии
Минздрава России, Институт экспериментальной кардиологии,
121359 Москва, Россия

⁴ Научно-производственная фирма ПОКАРД, 121359 Москва, Россия

⁵ Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова,
факультет фундаментальной медицины, 119991 Москва, Россия

Поступила в редакцию 23.07.18

После доработки 09.09.18

Принята к публикации 09.09.18

В работе впервые продемонстрировано, что иммобилизованный лизоцим способен эффективно удалять из раствора липополисахариды (эндотоксины) бактерий *Escherichia coli* и *Pseudomonas aeruginosa*. Экспериментально подтвержденная сорбционная емкость составила не менее 400 нг эндотоксина на 1 мл сорбента. Была показана совместимость с цельной кровью человека для нового сорбента. Таким образом, новый сорбент потенциально может применяться в процедурах экстракорпоральной терапии при лечении сепсиса.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: сорбция эндотоксина, сепсис, иммобилизованный лизоцим.

DOI: 10.1134/S0320972519010081

Сепсис – тяжелое инфекционное заболевание, сопровождающееся полиорганной недостаточностью и возникающее вследствие проникновения и циркуляции патогенных микроорганизмов и их токсинов в кровотоке человека. В настоящее время в результате появления новых устойчивых к антибиотикам штаммов микроорганизмов проблема лечения сепсиса является серьезным вызовом современной медицине [1]. Ежегодно в мире умирает от сепсиса >5 млн человек [2]. Одной из ключевых задач в лечении сепсиса является проблема удаления из кровотока

бактериальных липополисахаридов (эндотоксинов), которые воздействуют на иммунную систему и значительно ухудшают состояние пациента [3, 4]. В настоящее время для удаления эндотоксина применяются экстракорпоральные методы лечения с использованием хроматографических материалов на основе различных полимеров для очистки плазмы крови пациента [5–7]. Сравнительно неплохие клинические результаты дает использование сорбционных материалов на основе иммобилизованного полимиксина Б, что позволяет повысить выживаемость пациентов до 51% в сравнении с выживаемостью 30% пациентов в контрольной группе [7, 8]. Полимиксин Б – это природный антибиотик, выделяемый из спорообразующих бактерий *Paenibacillus polymyxa* (*Bacillus polymyxa*), представляет собой смесь из 6 близких по струк-

* Первоначально английский вариант рукописи опубликован на сайте «Biochemistry» (Moscow) <http://protein.bio.msu.ru/biokhimiya>, в рубрике «Papers in Press», BM18-208, 22.10.2018.

** Адресат для корреспонденции.

туре веществ пептидной природы, имеющих в своем составе остатки стандартных и нестандартных аминокислот [9].

На сегодняшний день вопрос разработки новых эффективных сорбционных материалов для удаления эндотоксина остается актуальным. Кроме того, важной задачей является разработка материалов, совместимых не только с плазмой, но и с цельной кровью, что может расширить возможности их медицинского применения.

В наших предыдущих работах было показано, что яичный куриный лизоцим способен эффективно сорбироваться на клетках различных микроорганизмов, соответственно, способен связываться с веществами поверхности клеток [10, 11]. Таким образом, мы предположили, что иммобилизованный лизоцим потенциально может оказаться подходящим материалом для удаления эндотоксина из биологических жидкостей. На настоящий момент нет сведений о практическом применении иммобилизованного лизоцима в качестве сорбента, способность связывать лизоцимом эндотоксины бактерий из литературы также не известна. Целью данной работы стало приготовление сорбента на основе нерастворимой полимерной матрицы и ковалентно иммобилизованного лизоцима и исследование сорбции этим материалом эндотоксина и его гемосовместимости.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Материалы и оборудование. В работе использованы следующие реактивы: лизоцим из куриных яиц, *Micrococcus luteus* (лиофилизированные клетки), BrCN, диоксан, этаноламин, ЭДТА, MES, ацетат натрия, Tris, Кумасси R250, дитиотреитол, 2-меркаптоэтанол, бромфеноловый синий («Sigma», США); КОН, NaOH, H_3BO_3 , K_2HPO_4 , K_2HPO_4 , HCl, ТЕМЕД, персульфат аммония («Хеликон», Россия); набор для определения активности эндотоксина LAL-тест (Лизат амебоцитов *Limulus*), хромогенный метод определения эндотоксина по конечной точке («Nucult Biotech», Нидерланды); акриламид, N,N'-метилен-бис-акриламид («Panreac», Испания); набор белков-маркеров для электрофореза (фосфоорилаза В, БСА, овальбумин, карбангидраза, ингибитор трипсина из сои, лизоцим) («BioRad», США); иммуноглобулин человека Sandoglobulin («Sandoz», Германия); набор реагентов для иммуноферментного определения концентрации общего иммуноглобулина класса G («Вектор-Бест», Россия); стандарт эндотоксина *Escherichia coli* («Charles River Laboratories», США); стандарт эндотоксина *Pseudomonas aeruginosa* (Пироген-

нал) («Медгамал», Россия); вода для LAL-теста («Пиротест», Россия), полимерная матрица Workbeads 200SEC («Bio-Works», Швеция); гепарин (фармакологическая субстанция) («Bioiberica», Испания). Если не указано иное, то в работе использовалась бидистиллированная вода. Для работы применяли следующее оборудование: спектрофотометр UV-1800 («Shimadzu», Япония), планшетный спектрофотометр Multiskan FC («Thermo Scientific», США), центрифугу Minispin («Eppendorf», Германия); термостат суховоздушный ТВ-80-1 («МедЛайф», Россия), термостат водяной ЛТ-105а («ЛОИР», Россия), гематологический анализатор Elite3 («Erba Mannheim», Чехия), весы аналитические ОН-РА64 («Ohaus», США), шейкер OS-20 («BioSan», Латвия), камеру для электрофореза VE-10 («Helicon», Россия), хроматограф АКТА Start («GE Healthcare», Швеция).

Иммобилизация лизоцима. При иммобилизации за основу была взята стандартная методика активации полисахаридных матриц с помощью BrCN [12]. Промывали 30 мл матрицы Workbeads 200SEC на стеклянном фильтре при температуре 5 °С сначала водой (150 мл), затем раствором, содержащим 4 М КОН и 1,6 М KH_2PO_4 (150 мл). Затем гель переносили в отдельную емкость, добавляли 30 мл раствора, содержащего 4 М КОН и 1,6 М KH_2PO_4 , затем добавляли 3,6 мл раствора BrCN с концентрацией 1 г/мл в диоксане. Выдерживали смесь при перемешивании на ледяной бане в течение 10 мин. Активированную матрицу переносили на стеклянный фильтр, промывали 150 мл воды при температуре 5 °С, затем – 150 мл буферной смеси 0,2 М H_3BO_3 –NaOH, pH 8,0. Гель переносили в закрытую емкость, добавляли 30 мл раствора лизоцима (в концентрации 10 мг в 1 мл буферной смеси, содержащей 0,2 М H_3BO_3 –NaOH, pH 8,0). Смесь выдерживали при помешивании при температуре 20 °С в течение 3 ч. По окончании иммобилизации измеряли поглощение надосадочной жидкости при длине волны 280 нм для определения несвязанного лизоцима и расчета выхода реакции. Полученный сорбент промывали 150 мл воды на стеклянном фильтре, добавляли 30 мл раствора 1 М этаноламина (pH 8,0 довели раствором HCl), выдерживали в течение 2 ч при температуре 20 °С. Сорбент промывали на стеклянном фильтре 150 мл воды, затем 150 мл раствора 10 мМ KH_2PO_4 – K_2HPO_4 , pH 7,0, содержащего 130 мМ NaCl.

Исследование сорбции эндотоксина на иммобилизованном лизоциме. Для этого использовали метод сорбции в объеме. В пластиковые пробирки помещали по 100 мкл сорбентов, промывали 20 объемами воды для LAL-теста. Концентрированные растворы эндотоксинов добавляли в

раствор 10 мМ KH_2PO_4 – K_2HPO_4 pH 7,0, содержащего 130 мМ NaCl, до конечной концентрации 20 и 50 нг/мл. Далее полученный раствор эндотоксина добавляли к сорбентам с нагрузкой 10 объемов раствора на 1 объем сорбента и инкубировали 30 и 60 мин при температуре 20 °С на качалке. По окончании инкубации отбирали образцы надосадочной жидкости, разводили их в 200 раз водой для LAL-теста. Определяли концентрацию эндотоксина по его активности в пробах с помощью LAL-теста по конечной точке [13]. В качестве контроля проводили проверку сорбции эндотоксина на исходной матрице Workbeads 200SEC и на матрице Workbeads 200SEC, которая была подвергнута процедурам активации BtCN с последующей блокировкой этаноламином без иммобилизации лизоцима.

Хранение иммобилизованного лизоцима. Препарат хранили при температуре 5 °С в виде 50%-ной суспензии, содержащей 50% осадка по объему, в буферной смеси 10 мМ KH_2PO_4 – K_2HPO_4 pH 7,0, содержащей 130 мМ NaCl, 0,3% по массе NaN_3 .

Исследование гемосовместимости сорбента. Кровь доноров брали в пробирки объемом 50 мл с предварительно добавленным гепарином до конечной концентрации 2,5 ед/мл. Операции с сорбентом проводили при температуре 20 °С. Помещали 200 мкл сорбента в микроколону с фильтром, имеющем поры размером 133 мкм, сорбент промывали 2 мл физиологического раствора (0,15 М NaCl), снизу на колонку надевали силиконовый шланг диаметром 0,5 мм для увеличения времени контакта крови с сорбентом. Затем проводили предобработку сорбента гепарином путем инкубации сорбента с двукратным объемом физиологического раствора с добавленным гепарином из расчета 100 ед гепарина на 1 мл сорбента, перемешивали 10 мин. Предобработка гепарином рекомендуется для систем, используемых в процедурах экстракорпоральной терапии [14]. Проводили хроматографию каждой порции сорбента с 4 мл крови самотеком, время контакта составляло 25–30 мин. Кровь после хроматографии собирали в пробирки на 15 мл. В качестве отрицательного контроля использовали колонку без сорбента. В кровь после колонки добавляли ЭДТА до конечной концентрации 10 мМ, помещали в пробирки по 1 мл и проводили измерения на гематологическом анализаторе, определяя количество эритроцитов, тромбоцитов, лимфоцитов, концентрацию гемоглобина и гематокрит.

Определение активности растворимого лизоцима на клетках. Препарат клеток *M. luteus* готовили путем добавления 5 мг высушенных клеток в 10 мл буферной смеси 0,01 М Tris-MES-Ас, pH 8,5, при температуре 20 °С. Перед использованием

суспензию клеток *M. luteus* центрифугировали в течение 5 мин при скорости 500 об./мин при температуре 5 °С и ресуспендировали в буферной смеси, содержащей 0,01 М Tris-MES-Ас, pH 8,5. Бактериолитическую активность лизоцима определяли турбидиметрическим методом по падению оптического поглощения суспензии клеток при длине волны 650 нм. Скорость изменения оптического поглощения прямо пропорциональна скорости лизиса клеток [15, 16]. Измерения проводили в буферной смеси 0,01 М Tris-MES-Ас с pH 8,5 при температуре 37 °С. Количество добавляемых в реакционную смесь бактериальных клеток подбирали таким образом, чтобы начальное оптическое поглощение было 0,5–0,55. Измерения оптического поглощения проводили в кюветах с притертой крышкой объемом 0,5 мл. В экспериментах по измерению активности в 1 мл раствора содержалось 0,1–2 мкг лизоцима. После добавления фермента в кювету прописывали кинетику изменения оптического поглощения в течение 5–7 мин, начальные скорости определяли на участке 2–3 мин. Для учета поправки скорости лизиса на фоновое изменение оптического поглощения ставили контрольные эксперименты без добавления фермента. Скорость ферментативного лизиса клеток пропорциональна концентрации фермента в диапазоне до 2 мкг в 1 мл смеси.

Определение активности иммобилизованного лизоцима на клетках. Подготовка реакционной смеси проводилась аналогично, как в случае растворимого лизоцима. Проводили измерение падения оптического поглощения суспензии клеток при длине волны 650 нм. Измерения проводили в тех же условиях (буферной смеси и температуре). В смесь добавляли препарат иммобилизованного лизоцима в расчете 20–70 мкл на 1 мл раствора. Реакционную смесь инкубировали в пробирках (по 10 мл) в термостате на шейкере-ротаторе при 10 об./мин (при скоростях вращения более 14 об./мин появляется эффект разрушения клеток без действия фермента, вероятно, вследствие механического воздействия на клетки гранул препарата). Отбирали из смеси образцы по 1 мл каждые 2 мин, оставляя дальше инкубироваться остальную смесь. Отобранные образцы по 1 мл помещали в пробирки, давали осесть частицам иммобилизованного фермента (30 с), затем измеряли оптическую плотность надосадочной жидкости (суспензии клеток без иммобилизованного фермента). Строили зависимость изменения оптического поглощения во времени в течение 10–15 мин, по наклону зависимости определяли скорость изменения оптического поглощения во времени. Для учета поправки скорости лизиса на фо-

новое изменение оптического поглощения ставили контрольные эксперименты, добавляя в смесь матрицу без лизоцима вместо препарата иммобилизованного фермента. Скорость ферментативного лизиса клеток пропорциональна количеству препарата иммобилизованного фермента в диапазоне до 70 мкл в 1 мл смеси.

Исследование смыва с гелей препаратов иммобилизованного лизоцима. В колонку высотой 5 см и сечением 1 см² помещали 2 мл 50%-ной суспензии сорбента. Собирали смыв с сорбента, выходящий самотеком. Измеряли скорость лизиса бактериальных клеток *M. luteus* аналогично описанной ранее процедуре для растворимого лизоцима при добавлении к ним полученного на выходе из колонки смыва. Строили калибровочную зависимость активности от концентрации лизоцима, измеренной в буферной смеси, в которой хранился иммобилизованный фермент. По калибровочной кривой определяли количество лизоцима в смывах [10].

Исследование гемолиза в присутствии свободного лизоцима. Кровь доноров готовили так же, как описано в разделе «Исследование гемосовместимости сорбента». К 2 мл крови добавляли 50 мкл физиологического раствора (отрицательный контроль) или раствора лизоцима разной концентрации (2, 4, 8 и 16 мг/мл) в физиологическом растворе. Все препараты готовили в четырех повторах. Образцы выдерживали в термостате 120 мин при слабом покачивании при температуре 37 °С. По окончании инкубации разделяли плазму и форменные элементы крови осадением на центрифуге при 3000 г. Определяли процент гемолиза по Ягеру [17].

Исследование связывания белков плазмы крови сорбентом. Хроматографию проводили при температуре 20 °С при скорости подачи раствора 0,5 мл/мин. Колонку (1 см × 1 см²), содержащую сорбент, промывали 15 мл буферной смеси 10 мМ КН₂РО₄–К₂НРО₄, рН 7,0, содержащей 130 мМ NaCl, и пропускали 10 мл плазмы крови человека. Затем колонку промывали 15 мл буферной смеси 10 мМ КН₂РО₄–К₂НРО₄, рН 7,0, содержащей 130 мМ NaCl. Плазму после пропускания через колонку собирали, контролируя оптическое поглощение при 280 нм по детектору. Элюирование белков проводили сначала 7 мл буферной смеси 0,2 М Gly–HCl, рН 2,5, после этого промывали сорбент 10 мл буферной смеси 10 мМ КН₂РО₄–К₂НРО₄, рН 7,0, содержащей 130 мМ NaCl. Затем через колонку пропускали 7 мл буферной смеси 0,1 М NaHCO₃–NaOH, рН 10,0. Элюат собирали по фракциям объемом 1 мл. В полученных фракциях и в плазме до и после хроматографии измеряли концентрацию общего белка микробиуретовым методом [18] с

модифицированным реагентом Бенедикта [19]. Концентрацию IgG в образцах определяли методом ИФА. Белковый состав полученных фракций элюатов исследовали методом Ds-Na-ПААГ-электрофореза [20] с градиентом концентрации акриламида 4–22%. Электрофорез проводили с восстанавливающими реагентами и без них.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Получение и характеристика сорбента с иммобилизованным лизоцимом. Выход при иммобилизации лизоцима составил $96 \pm 1\%$, количество иммобилизованного лизоцима, соответственно, было 9,6 мг на 1 мл геля.

Исследование эффективности связывания сорбентом эндотоксинов. В табл. 1 представлены данные по связыванию иммобилизованным лизоцимом бактериальных токсинов (липополисахаридов) микроорганизма *Escherichia coli* (кишечная палочка) семейства Enterobacteriaceae и микроорганизма *Pseudomonas aeruginosa* (синегнойная палочка) семейства Pseudomonadaceae. В табл. 1 приведены данные для 30 мин контакта раствора эндотоксина с сорбентом. Для 30 и 60 мин контакта результаты сорбции не отличались в пределах погрешности эксперимента. В контрольных экспериментах с матрицей Workbeads 200SEC без иммобилизованного лизоцима сорбции эндотоксинов не наблюдалось в пределах погрешности эксперимента. Как видим, во всех случаях было удалено >80% эндотоксина из раствора. Поскольку после 30 мин контакта с сорбентом уровень сорбции не меняется, то мо-

Таблица 1. Связывание эндотоксинов сорбентом

Тип эндотоксина; концентрация в исходном растворе, нг в мл	Сорбция эндотоксина, нг на 1 мл сорбента	Остаточная концентрация в растворе, нг в мл	Удаление эндотоксина, %
<i>E. coli</i> ; 20	177 ± 14	$2,3 \pm 1,4$	89
<i>E. coli</i> ; 50	441 ± 21	$5,9 \pm 2,1$	88
<i>P. aeruginosa</i> ; 20	170 ± 16	$3,0 \pm 1,6$	85
<i>P. aeruginosa</i> ; 50	419 ± 24	$8,1 \pm 2,4$	84

Примечание. Раствор эндотоксина в экспериментах взят в 10-кратном объеме по отношению к объему сорбента. Все эксперименты сделаны в пяти повторах. Значения погрешностей рассчитывали по распределению Стьюдента для доверительного интервала 95%.

жем считать, что система пришла к равновесию, соответственно мы можем построить изотермы сорбции (зависимости связанного эндотоксина от концентрации свободного эндотоксина). Как видим на рисунке, зависимость хорошо описывается линейной функцией уравнения изотермы Генри:

$$S = A \times C_f, \quad (1)$$

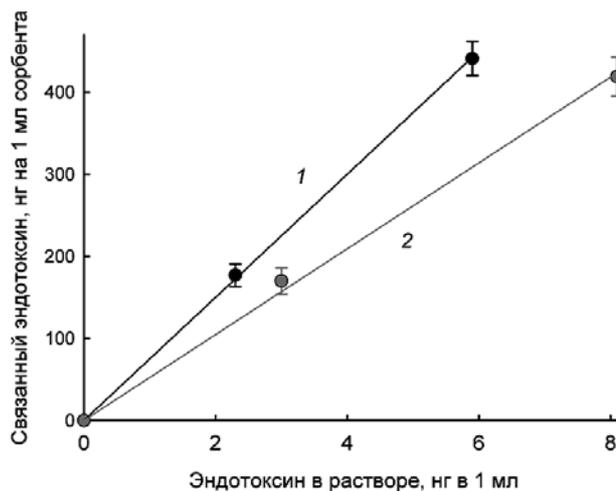
где S – количество сорбированного эндотоксина (нг на 1 мл сорбента), C_f – концентрация свободного эндотоксина в растворе (нг/мл), A – безразмерный коэффициент. Путем несложных преобразований получаем выражение для доли удаленного эндотоксина в зависимости от объема раствора с эндотоксином и объема сорбента:

$$EF = \frac{A \cdot V_s}{V + A \cdot V_s} \cdot 100\%, \quad (2)$$

где EF – общая доля всего удаленного эндотоксина из всего раствора в %, V – общий объем раствора в мл, V_s – объем сорбента в мл.

Используя аппроксимацию экспериментальных данных, получаем для A значения 75 и 52 безразмерных единиц для сорбции эндотоксинов *E. coli* и *P. aeruginosa* соответственно, считая концентрацию эндотоксина в растворе в нг/мл и сорбированный эндотоксин в нг на 1 мл сорбента. В табл. 2 приведены теоретически рассчитанные значения доли удаляемого эндотоксина в случае 1 л раствора и 50, 100 и 200 мл сорбента, что соответствует реально применяемым объемам различных сорбентов в медицинских процедурах. Как видно из табл. 2, во всех случаях эффективность удаления эндотоксина высокая и составляет 72–94%.

Литературные данные относительно уровня эндотоксина у различных пациентов имеют достаточно большой разброс, связанный с проблемами его точного определения в реальной биологической жидкости. Эндотоксин измеряют по его биологической активности, которая варьирует для разных штаммов микроорганизмов и разных способов измерения, кроме того молекулы эндотоксина могут образовывать с другими веществами комплексы, что также искажает результаты [21–23]. Тем не менее можно выделить приблизительные цифры для оценки. Например, в ряде исследований средние уровни эндотоксина в плазме крови составляли 0,034 и 0,126 нг/мл, у пациентов с сепсисом, которые выжили после лечения, а также у погибших [24]. Как мы видели выше, новый сорбент способен эффективно связывать эндотоксин из раствора и в существенно больших концентрациях.



Зависимость количества связанного на сорбенте эндотоксина от концентрации в растворе свободного эндотоксина. 1 – эндотоксин *E. coli*; 2 – эндотоксин *P. aeruginosa*

Стабильность сорбционных характеристик при хранении. При хранении при температуре 5 °С в виде суспензии в буферном растворе препарат иммобилизованного лизоцима сохранял сорбционные характеристики как минимум в течение 3 мес.

Проверка гемосовместимости сорбента. Результаты проверки гемосовместимости полученного сорбента приведены в табл. 3. Как видим, почти все исследуемые параметры меняются незначительно. Немного изменяется концентрация тромбоцитов, однако эти изменения носят допустимый уровень, не выходящий за рамки нормы [25]. Таким образом, можно утверждать, что сорбент с иммобилизованным лизоцимом совместим с цельной кровью.

Исследование возможной утечки лиганда (лизоцима). Исследования смывов с сорбента пока-

Таблица 2. Расчетные величины эффективности удаления эндотоксинов из 1 л раствора сорбентом разного объема*

Объем сорбента, мл	Удаление эндотоксина <i>E. coli</i> , %	Удаление эндотоксина <i>P. aeruginosa</i> , %
50	79	72
100	88	84
200	94	91

* В предположении линейного характера изотермы сорбции (что, согласно данным табл. 1 и расчетам, будет как минимум до концентрации 26 нг в 1 мл исходного раствора эндотоксина *E. coli* и 29 нг в 1 мл исходного раствора эндотоксина *P. aeruginosa* в случае объема сорбента 50 мл).

Таблица 3. Показатели крови после контакта с сорбентом

Параметры	Кровь в контроле	Кровь после контакта с сорбентом
Эритроциты		
эритроциты, 10^{12} кл/л	$5,05 \pm 0,11$	$4,90 \pm 0,13$
средний объем эритроцита, фл	$83,0 \pm 2,3$	$82,5 \pm 2,1$
среднее содержание гемоглобина в эритроците, пг	$26,2 \pm 0,9$	$25,9 \pm 1,1$
средняя концентрация гемоглобина в эритроцитах, г/л	316 ± 15	309 ± 12
Тромбоциты		
тромбоциты, $\times 10^9$ кл/л	210 ± 22	152 ± 23
тромбокрит, %	$0,17 \pm 0,01$	$0,10 \pm 0,01$
средний объем тромбоцитов, фл	$7,9 \pm 0,8$	$7,6 \pm 0,9$
Лимфоциты		
лейкоциты, $\times 10^9$ кл/л	$5,5 \pm 0,3$	$4,3 \pm 0,4$
лимфоциты, $\times 10^9$ кл/л	$1,6 \pm 0,3$	$1,5 \pm 0,3$
моноциты, $\times 10^9$ кл/л	$0,58 \pm 0,09$	$0,47 \pm 0,11$
Гемоглобин, г/л	$129,0 \pm 3,0$	$128,5 \pm 2,9$
Гематокрит, %	$41,8 \pm 0,6$	$40,9 \pm 0,8$

Примечание. При проведении хроматографии через 1 мл сорбента пропускали 4 мл крови самотеком. Время контакта крови с сорбентом составляло 25–30 мин. Все эксперименты были сделаны в пяти повторах. Значения погрешностей рассчитывали по распределению Стьюдента для достоверного интервала 95%.

зали, что в течение суток после отмывки сорбента свободного лизоцима по активности не обнаруживается. Лизоцим по активности может быть обнаружен уже при концентрации 0,05 мкг/мл. При более длительном хранении препарата была обнаружена небольшая утечка лизоцима в пределах 0,3–0,5 мкг с 1 мл матрицы за 10 дней (до 0,0033% от иммобилизованного количества фермента, 15 мг/мл). Если принять, что отрыв лиганда от матрицы идет по типу реакции первого порядка ($k = 300\ 003$ дней⁻¹), то из скорости утечки можно оценить период полураспада (потерю 50% лиганда) как 207902 дня или ~569,6 лет. После каждой отмывки препарата иммобилизованного фермента утечка продолжалась аналогичным образом. Мы связываем явление утечки лиганда с недостаточной стабильностью связей, получаемых при активации матрицы ВrCN. Впрочем, для экстракорпоральных процедур в медицине используют сорбенты, полученные с помощью иммобилизации белка на полисахаридной матрице, активированной ВrCN [26]. Подобная ситуация с утечкой лиганда не несет существенных рисков для технологического применения сорбента, т.к. перед проведением медицинской процедуры сорбенты промывают. Ранее в литературе не было описано подобной ситуации с утечкой белка, иммобилизованного с помощью ВrCN, что на наш взгляд может быть отчасти связано с тем, что большинство пригодных для использования в биохимии методов определения общего белка обычно имеют пределы обнаружения не менее 1 мкг в мл [18].

Определение бактериолитической активности иммобилизованного лизоцима. При измерении бактериолитической активности было определено, что иммобилизованный лизоцим (25 мкл), добавленный в 1 мл реакционной смеси обеспечивает скорость лизиса клеток (скорость падения оптического поглощения) $(7,5 \pm 0,8) \times 10^{-3}$ мин⁻¹. Добавление в реакционную смесь 0,1 мкг/мл растворимого лизоцима имеет приблизительно такую же активность, а именно $(7,3 \pm 0,6) \times 10^{-3}$ мин⁻¹. В 25 мкл иммобилизованного фермента содержится ~375 мкг лизоцима, что в 3750 раз больше количества растворимого лизоцима, проявляющего такую же активность. Фактически только малая часть лизоцима, иммобилизованного в полимерных гранулах, стерически доступна и взаимодействует с субстратом, что неудивительно ввиду большого размера последнего (бактериальных клеток).

Исследование гемолиза в присутствии растворимого лизоцима. Нами было проведено исследование гемолиза в присутствии растворимого лизоцима. Добавление в образцы крови свободного лизоцима до концентраций 0,05–0,4 мг/мл не приводило к увеличению гемолиза при наблюдении в течение 2 ч. Таким образом, лизоцим даже в случае утечки из сорбента не представляет серьезной опасности для таких клеток как эритроциты.

Исследование неспецифического связывания белков плазмы крови. Для исследования возможного связывания сорбентом белков плазмы крови, нами была проведена колоночная хромато-

графия. Через колонку с 1 мл сорбента было пропущено 10 мл плазмы крови. После промывки колонки было проведено элюирование буферными смесями с различным значением pH: 0,2 M Gly-HCl, pH 2,5, затем 0,2 M NaHCO₃-NaOH, pH 10,0. Было обнаружено, что в кислом буфере элюируется компактный пик белка, а затем в щелочном буфере элюирования белков не наблюдается. Значение pI лизоцима в зависимости от ионной силы 10,2–10,35 [27], поэтому теоретически можно было бы ожидать, что иммобилизованный лизоцим, подобно положительно заряженному ионообменному хроматографическому материалу, будет неспецифически сорбировать разные отрицательно заряженные белки, которые будут элюироваться при щелочных значениях pH. На практике мы видим совершенно иную картину, т.к. элюирование связанных белков произошло при кислом значении pH. Было проведено исследование белков элюата с помощью Ds-Na-ПААг-электрофореза. Без восстановления дисульфидных связей и при восстановлении дисульфидных связей белок элюата давал электрофоретическую картину, идентичную таковой для иммуноглобулина G (IgG), для целой молекулы, а также для легких и тяжелых цепей соответственно (электрофореграммы не приведены). ИФА также подтвердил, что белком элюата является IgG. Судя по картине окрашивания геля, элюат представлял собой практически очищенный препарат IgG без заметного присутствия примесей (>80% чистоты). Сорбционная емкость составила $5,8 \pm 0,7$ мг IgG на 1 мл сорбента. В исходной плазме концентрация иммуноглобулинов составляла $10,2 \pm 0,4$ мг в мл, поэтому удаление из 10 мл плазмы составило всего 5,7%. В плане терапевтического применения удаление части иммуноглобулинов не представляет большой угрозы здоровью пациента. Иммуноглобулины целенаправленно удаляют при различных заболеваниях с помощью специальных сорбентов в существенно больших количествах [28]. В случае острой необходимости можно также компенсировать потерю с помощью инъекции донорских IgG.

В литературе не описан сам факт связывания лизоцима именно с общими IgG, а не со специально подготовленными антителами против лизоцима. Способность лизоцима связываться с иммуноглобулинами с точки зрения иммунологии может иметь значение в том, что, связываясь с бактериальными клетками, лизоцим сам по себе способен усиливать опсонизацию клеток патогена, облегчая фагоцитоз. В литературе есть предположения, что лизоцим действительно может играть роль опсонина [29], однако на сегодня такая возможная роль лизоцима считалась результа-

том изменения распределения зарядов на поверхности патогена при связывании лизоцима, а версия комплексообразования с IgG даже не рассматривалась до сих пор. Явление связывания лизоцима и IgG требует дальнейшего пристального изучения, т.к. это может открыть новые аспекты взаимодействия иммунной системы с патогеном.

Таким образом, настоящее исследование продемонстрировало, что иммобилизованный лизоцим действительно способен эффективно связывать эндотоксины как из *E. coli*, так и из *P. aeruginosa*. Такой лиганд как лизоцим с точки зрения биотехнологии весьма привлекателен, т.к. он нетоксичен и коммерчески доступен. В сравнении с лизоцимом полимиксин Б является более дорогостоящим веществом, а кроме того токсичным, ввиду чего в литературе многие годы ведутся дискуссии о рисках использования его растворимой формы в медицине [30]. Кроме всего прочего, лизоцим в качестве иммобилизованного лиганда может быть использован на различных полимерных материалах, что его выгодно отличает от различных низкомолекулярных лигандов, включая полимиксин Б, сорбционные свойства которых в значительной степени могут зависеть от характера матрицы, на которой они иммобилизованы. Дальнейшая оптимизация структурно функциональных свойств материалов на основе иммобилизованного лизоцима может дополнительно улучшить сорбционные характеристики. Тот факт, что новый сорбционный материал обладает совместимостью с цельной кровью, еще больше расширяет возможности его применения в медицине.

Финансирование

Работа выполнена при финансовой поддержке ФЦП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2014–2020 годы» по теме: «Создание новых медицинских сорбционных материалов для экстракорпоральных методов лечения сепсиса, сочетающих противомикробное действие и способность к сорбции бактериальных токсинов» (шифр заявки 2017-14-576-0053-142, уникальный идентификатор проекта RFMEFI57417X0181, соглашение № 14.574.21.0181).

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм

Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с использованием людей и животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Cohen, J. (2002) The immunopathogenesis of sepsis, *Nature*, **420**, 885–891.
- Fleischmann, C., Scherag, A., Adhikari, N.K., Hartog, C.S., Tsaganos, T., Schlattmann, P., Angus, D.C., and Reinhart, K. (2016) Assessment of global incidence and mortality of hospital-treated sepsis. Current estimates and limitations, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, **193**, 259–272.
- Danner, R.L., Natanson, C., Elin, R.J., Hosseini, J.M., Banks, S., MacVittie, T.J., and Parrillo, J.E. (1990) *Pseudomonas aeruginosa* compared with *Escherichia coli* produces less endotoxemia but more cardiovascular dysfunction and mortality in a canine model of septic shock, *Chest*, **98**, 1480–1487.
- Opal, S.M. (2010) Endotoxins and other sepsis triggers, *Contrib. Nephrol.*, **167**, 14–24.
- Ongekudon, C.M., Chew, J.H., Liu, B., and Danquah, M.K. (2012) Chromatographic removal of endotoxins: a bio-process engineer's perspective, *ISRN Chromatography*, **649746**, 1–9.
- Esteban, E., Ferrer, R., Alsina, L., and Artigas, A. (2013) Immunomodulation in sepsis: the role of endotoxin removal by polymyxin B-immobilized cartridge, *Mediators Inflamm.*, **507539**, 1–12.
- Anspach, F.B., and Hilbeck, O. (1995) Removal of endotoxins by affinity sorbents, *J. Chromatogr. A*, **711**, 81–92.
- Yaroustovsky, M., Abramyan, M., Komardina, E., Nazarova, H., Popov, D., Plyushch, M., Soldatkina, A., and Rogalskaya, E. (2018) Selective LPS adsorption using polymyxin B-immobilized fiber cartridges in sepsis patients following cardiac surgery, *Shock*, **49**, 658–666.
- Orwa, J.A., Govaerts, C., Busson, R., Roets, E., van Schepdael, A., and Hoogmartens, J. (2001) Isolation and structural characterization of polymyxin B components, *J. Chromatogr. A*, **912**, 369–373.
- Sedov, S.A., Belogurova, N.G., Shipovskov, S., Levashov, A.V., and Levashov, P.A. (2011) Lysis of *Escherichia coli* cells by lysozyme: discrimination between adsorption and enzyme action, *Colloids Surf. B Biointerfaces*, **88**, 131–133.
- Матолыгина Д.А., Осипова Е.Э., Смирнов С.А., Белогурова Н.Г., Еремеев Н.Л., Тишков В.И., Левашов А.В., Левашов П.А. (2015) Определение активности и изменение сорбции бактериолитического фермента в системе живых клеток *Lactobacillus plantarum*, *Вестник Московского университета. Серия 2: Химия*, **56**, 365–371.
- Porath, J., and Axe, R. (1976) Immobilization of enzymes to agar, agarose, and Sephadex supports, *Methods Enzymol.*, **44**, 19–45.
- Schaumberger, S., Ladinig, A., Reisinger, N., Ritzmann, M., and Schatzmayr, G. (2014) Evaluation of the endotoxin binding efficiency of clay minerals using the Limulus Amebocyte lysate test: an *in vitro* study, *AMB Express*, **4**, 1–9.
- Schmaldienst, S., Goldammer, A., Spitzauer, S., Derfler, K., Horl, W.H., and Knobl, P. (2000) Local anticoagulation of the extracorporeal circuit with heparin and subsequent neutralization with protamine during immunoadsorption, *Am. J. Kidney Dis.*, **36**, 490–497.
- Levashov, P.A., Sedov, S.A., Belogurova, N.G., Levashov, A.V., and Shipovskov, S. (2010) Quantitative turbidimetric assay of enzymatic gram-negative bacteria lysis, *Anal. Chem.*, **82**, 2161–2163.
- Матолыгина Д.А., Душутина Н.С., Овчинникова Е.Д., Еремеев Н.Л., Белогурова Н.Г., Атрошенко Д.Л., Смирнов С.А., Савин С.С., Тишков В.И., Левашов А.В., Левашов П.А. (2018) Единый подход для расчета скорости ферментативного лизиса живых бактериальных клеточных субстратов турбидиметрическим методом, *Вестник Московского университета. Серия 2: Химия*, **59**, 125–131.
- Jager, F.C. (1968) Determination of vitamin E requirement in rats by means of spontaneous haemolysis *in vitro*, *Nutr. Dieta Eur. Rev. Nutr. Diet.*, **10**, 215–223.
- Levashov, P.A., Sutherland, D.S., Besenbacher, F., and Shipovskov, S. (2009) A robust method of determination of high concentrations of peptides and proteins, *Anal. Biochem.*, **395**, 111–112.
- Левашов П.А., Овчинникова Е.Д., Афанасьева М.И., Фрид Д.А., Азьмуко А.А., Беспалова Ж.Д., Адамова И.Ю., Афанасьева О.И., Покровский, С.Н. (2012) Аффинный сорбент на основе триптофилтреонилтирозина для связывания иммуноглобулинов класса G: сорбционные характеристики и аспекты практического применения, *Биоорг. химия*, **38**, 58–63.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature*, **227**, 680–685.
- Hurley, J.C., Nowak, P., Ohrmalm, L., Gogos, Ch., Armaganidis, A., and Giamarellos-Bourboulis, E.J. (2015) Endotoxemia as a diagnostic tool for patients with suspected bacteremia caused by gram-negative organisms: a meta-analysis of 4 decades of studies, *J. Clin. Microbiol.*, **53**, 1183–1191.
- Marshall, J.C., Walker, P.M., Foster, D.M., Harris, D., Ribeiro M., Paice, J., Romaschin, A.D., and Derzko, A.N. (2002) Measurement of endotoxin activity in critically ill patients using whole blood neutrophil dependent chemiluminescence, *Crit. Care*, **6**, 342–348.
- Schwarz, H., Gornicec, J., Neuper, Th., Parigiani, M.A., Wallner, M., Duschl, A., and Horejs-Hoec, J. (2017) Biological activity of masked endotoxin, *Sci. Rep.*, **7**, 1–11.
- Behre, G., Schedel, I., Nentwig, B., Wormann, B., Essink, M., and Hiddemann, W. (1992) Endotoxin concentration in neutropenic patients with suspected gram-negative sepsis: correlation with clinical outcome and determination of anti-endotoxin core antibodies during therapy with polyclonal immunoglobulin M-enriched immunoglobulins, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **36**, 2139–2146.
- Zaninetti, C., Biino, G., Noris, P., Melazzini, F., Civaschi, E., and Balduini, C.L. (2015) Personalized reference intervals for platelet count reduce the number of subjects with unexplained thrombocytopenia, *Haematologica*, **100**, 338–340.
- Kiseleva, E.A., Afanasieva, O.I., Kosheleva, N.A., and Pokrovsky, S.N. (1996) Immunosorbent for IgG apheresis: an *in vitro* study, *Transfus. Sci.*, **17**, 519–525.
- Wetter, L.R., and Deutsch, H.F. (1951) Immunological studies on egg white proteins. IV. Immunochemical and physical studies of lysozyme, *J. Biol. Chem.*, **192**, 237–242.
- Blaha, M., Pit'ha, J., Blaha, V., Lanska, M., Maly, J., Filip, S., and Langrova, H. (2010) Extracorporeal immunoglobulin elimination for the treatment of severe myasthenia gravis, *J. Biomed. Biotechnol.*, 1–6.
- Daniel, M.P. Gaikwad, V., Verghese, M., Abraham, R., and Kapoor, R. (2015) Serum lysozyme (Muramidase) Levels in intra-abdominal abscesses: An experimental study, *Indian J. Surg.*, **77**, 117–119.
- Falagas, M.E., and Kasiakou, S.K. (2006) Toxicity of polymyxins: a systematic review of the evidence from old and recent studies, *Crit. Care*, **10**, 1–13.

**NEW SORBENT ON THE BASIS
OF COVALENTLY IMMOBILIZED LYSOZYME FOR REMOVAL
OF BACTERIAL LIPOPOLYSACCHARIDE (ENDOTOXIN)
FROM BIOLOGICAL FLUIDS**

**P. A. Levashov^{1,2*}, D. A. Matolygina^{1,2}, E. D. Ovchinnikova³,
I. Yu. Adamova⁴, O. A. Dmitrieva³, A. V. Nuzhdina², N. S. Pokrovsky⁵,
and N. L. Ereemeev¹**

¹ *Lomonosov Moscow State University, Faculty of Chemistry, 119234 Moscow, Russia; E-mail: levashov@yahoo.com*

² *Bauman Moscow State Technical University, Interindustry Engineering Center for Composite Materials, 105005 Moscow, Russia*

³ *National Medical Research Center of Cardiology, Institute of Experimental Cardiology, Ministry of Healthcare of the Russian Federation, 121359 Moscow, Russia*

⁴ *POKARD Ltd., 121359 Moscow, Russia*

⁵ *Lomonosov Moscow State University, Faculty of Fundamental Medicine, 119991 Moscow, Russia*

Received July 23, 2018

Revision received September 9, 2018

Accepted September 9, 2018

It was demonstrated for the first time that immobilized lysozyme can effectively remove *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* lipopolysaccharides (endotoxins) from solutions. Experimentally confirmed sorption capacity for the developed sorbent was at least 400 ng of endotoxin per 1 ml sorbent. The new sorbent is compatible with the whole human blood and can be potentially used in extracorporeal therapy in the treatment of sepsis.

Keywords: endotoxin sorption, sepsis, immobilized lysozyme