

М.В. Савчук

**АДСОРБЦИОННЫЕ СВОЙСТВА РАЗЛИЧНЫХ МОДИФИКАЦИЙ
ПОЛИСУЛЬФОНА ПО ОТНОШЕНИЮ К ЛИПОПОЛИСАХАРИДАМ
КЛЕТОЧНОЙ СТЕНКИ ГРАМОТРИЦАТЕЛЬНЫХ БАКТЕРИЙ**

Научный руководитель: канд. биол. наук, ассист. Д.А. Макаревич

Кафедра биологической химии

Белорусский государственный медицинский университет, г. Минск

M.V. Savchuk

**ADSORPTION CHARACTERISTICS OF VARIOUS POLYSULFONE
MODIFICATIONS IN RELATION TO LIPOPOLYSACCHARIDES
OF THE OUTER MEMBRANE OF GRAM-NEGATIVE BACTERIA**

Tutor: PhD, assistant D.A. Makarevich

Department of Biological Chemistry

Belarusian State Medical University, Minsk

Резюме. Проведена серия из 6 стендовых экспериментов с полисульфоновыми (ПС) мембранами различных модификаций и способов стерилизации. Через колонки с ПС пропускался модельный раствор с нарастающей концентрацией ЛПС. После отбора проб определялась емкость образцов сорбента на основе ПС путем проведения LAL-теста. Было установлено, что ПС мембраны с закрытыми концами капилляров, газовой стерилизации обладают наибольшей связывающей способностью в отношении ЛПС грамотрицательных бактерий.

Ключевые слова: полисульфоновые мембраны, гемодиализ, LAL-тест, липополисахариды грамотрицательных бактерий, лигандизация мембран.

Resume. A series of 6 experiments with polysulfone (PS) membranes of various modifications and sterilization methods was carried out. A model solution with an increasing concentration of LPS was passed through columns with PS. After sampling, the capacity of the sorbent samples based on PS was determined by conducting a LAL-test. It was found that PS membranes with closed ends of capillaries, gas sterilization method have the greatest binding ability against LPS of Gram-negative bacteria.

Keywords: polysulfone membranes, hemodialysis, LAL-test, lipopolysaccharides of Gram-negative bacteria, membrane ligandization.

Актуальность. Полисульфон (ПС) – это неусиленный, аморфный полимер, главными характеристиками которого являются его высокие термические, электрические и механические свойства (рисунок 1) [2].

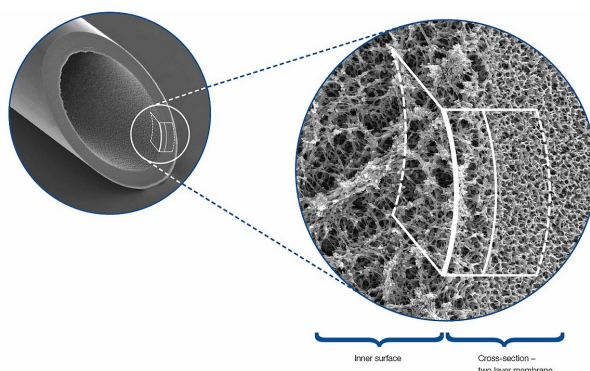


Рис. 1 – Фотография капилляра полисульфонового плазмодифильтра под электронным микроскопом

Одним из способов применения ПС является гемодиализ. Ввиду своей высокой биосовместимости, ПС заменил применяемые ранее для этих целей целлюлозные мембраны [1]. Эндотоксины представляют собой липополисахариды, термостабильный компонент наружной части клеточной стенки всех грамотрицательных микроорганизмов (рисунок 2). Попадание грамотрицательных микроорганизмов в организм человека часто приводит к развитию сепсиса. Эндотоксины, представляющие собой активные пирогенные вещества, - наиболее распространенная причина возникновения клинических проявлений при сепсисе.

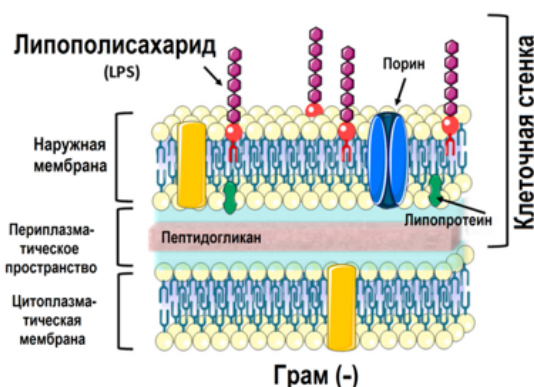


Рис. 2 – Строение клеточной стенки грамотрицательных бактерий

Самый чувствительным методом детекции эндотоксинов является LAL-тест. В 1972 году тест LAL получил широкое распространение в фармацевтической и медицинской промышленности [3]. В настоящее время LAL-тест является активно развивающимся методом контроля качества лекарственных средств, медицинского оборудования и имплантируемых медицинских изделий (рисунок 3).



Рис. 3 – Набор для проведения LAL-теста «Limulus Color KY Test Wako»

LAL-тест основан на реакции лизата клеток крови (амебоцитов) мечехвостов рода *Limulus* с эндотоксинами (LAL-тест – Лизат амебоцитов *Limulus*) [4]. С целью оценки контаминации эндотоксинами парентеральных лекарственных средств, медицинских изделий и растворов для диализа в 2012 году были согласованы три типа LAL-тестов (гелеобразующие, хромогенные и турбидиметрические методы) [3]. Хромогенный и турбидиметрический методы относятся к фотометрическим тестам, поскольку для анализа требуется оптический считыватель. Хромогенный анализ

проводится путем замены природного субстрата, коагулянта, на хромогенный или окрашенный. Хромогенный субстрат расщепляется ферментом коагулазой, активируемым эндотоксином, и хромогенная молекула высвобождается из субстрата в суспензию, которую измеряют с помощью спектрофотометрии (рисунок 4) [5].

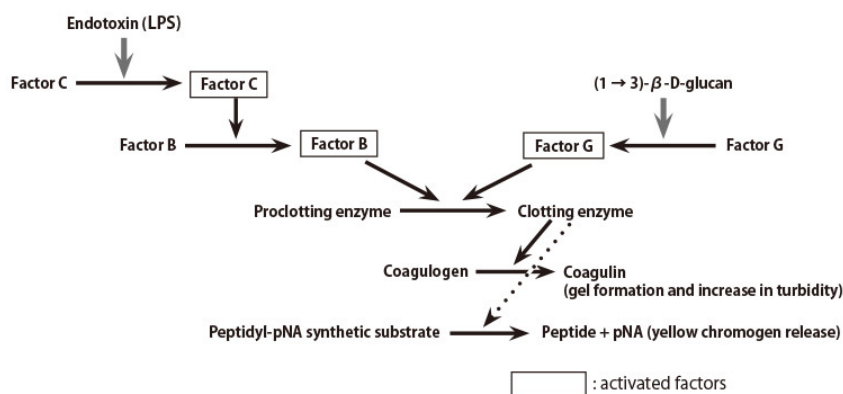


Рис. 4 – Принцип работы хромогенного LAL-теста

В настоящее время активно изучается возможность использования ПС для разработки специфических гемосорбентов путем его модификации и дальнейшей лигандизации. Гемосорбенты с различными лигандами (Полимиксин В; синтетический полипептид А, обладающий сродством к липиду А бактериального ЛПС) уже активно используются в Японии, Швеции и Германии.

Цель: изучить и сравнить уровень неспецифической адсорбции ЛПС грамотрицательных бактерий волокнами ПС с закрытыми и открытыми концами капилляров, ПС различных способов стерилизации.

Задачи:

1. Определить и рассчитать количество ЛПС в модельном растворе до и после динамического эксперимента.
2. Проанализировать изменения количества ЛПС в модельном растворе после динамического эксперимента, рассчитав емкость образцов сорбента на основе ПС.
3. Провести сравнительный количественный анализ полученных результатов при использовании ПС с закрытыми и открытыми концами капилляров, ПС радиационной и газовой стерилизации.
4. Выявить наиболее подходящую модификацию ПС и способ его стерилизации для дальнейших исследований.

Материалы и методы. Проведена серия из 6 стендовых экспериментов. Модельный раствор ЛПС пропускали через колонки с различными модификациями ПС (с закрытыми и открытыми концами капилляров; радиационной и газовой стерилизации) (рисунок 5). В ходе экспериментов моделировалось условие нарастания концентрации ЛПС (характерное для септической патологии). Так, в колонку последовательно подавался раствор, содержащий 15, 25, 50 нг ЛПС, контур замыкался, и в режиме рециркуляции продолжали эксперимент в течении 30 минут. После окончания эксперимента вытесняли остаток модельного раствора из кровопроводящих магистралей и гемосорбционной колонки объемом 150 мл. Для

определения концентрации ЛПС на выходе модельного раствора из колонки отбирали пробы в дублях после подачи каждого раствора. Также пробы отбирались и из всего объема пропущенных модельных растворов (300 мл). Проводили количественный LAL-тест (Limulus Color KY Test) для определения емкости образцов сорбента на основе ПС, для чего определяли процент изменения концентрации ЛПС в пробах до и после эксперимента (рисунок 6).



Рис. 5 – Колонки гемосорбционные «Фребор» с ПС, перистальтический

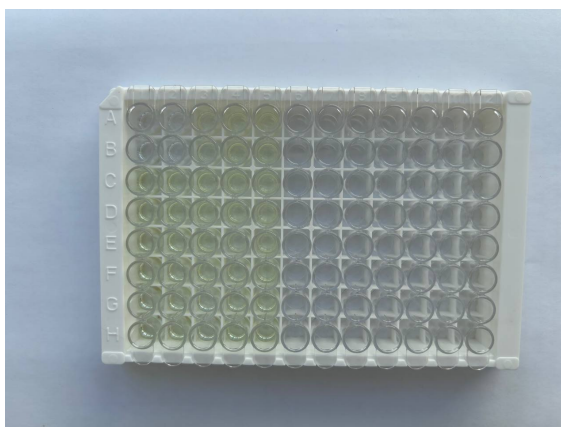


Рис. 6 – Микропланшет с отобранными пробами после проведения LAL-теста

Результаты и их обсуждение.

Табл. 1. Результаты динамического эксперимента с ПС различных модификаций и способов стерилизации

Модификации и способ стерилизации ПС	Концентрация липополисахарида, нг/мл			
	До	После	Процент сорбции, %	Емкость
Част. Закр. 360610 (R)	48,37	22,4	53,69	1,7 нг/г
Откр. 360610 (R)	48,37	48,02	0,2	-
Закр. 360610 (R)	103,46	60,21	41,80	2,82 нг/г
Част. закр. 360600 (R)	48,37	24,8	48,72	1,65 нг/г

Продолжение таблицы 1

Закр. (Газ)	360600	103,46	28,82	72,03	4,9 нг/г
Част. 360610 (Газ)	закр.	103,46	54,47	47,30	3,2 нг/г

Образцы полисульфона радиационной стерилизации в целом показали базовую емкость по ЛПС более 1,7 нг на 1 грамм сорбента, максимальный процент сорбции для ПС с данным видом стерилизации составил 53,69%. Образцы ПС газовой стерилизации отличались более высокой сорбционной способностью в отношении ЛПС кишечной палочки с базовой емкостью до 4,9 нг ЛПС на 1 г сорбента, максимальный процент сорбции для ПС с данным видом стерилизации составил 72,03%. Модификации ПС закрытого типа показали более высокие значения сорбционной емкости в отношении ЛПС (до 4,9 нг на 1 г сорбента), чем модификации ПС с открытыми и частично закрытыми концами капилляров, где процент сорбции составил 0,2% и 53,69% соответственно. Максимальный процент связанного ЛПС от исходно запущенного в контур для ПС с закрытыми концами капилляров составил 72,03% (таблица 1).

Выводы:

1. Газовая стерилизация придает образцам ПС более высокую сорбционную способность в отношении ЛПС кишечной палочки (4,9 нг ЛПС на 1 г сорбента).
2. Это делает данный вид стерилизации более предпочтительным для создания сорбента по удалению ЛПС из биологических жидкостей организма.
3. Модификации ПС закрытого типа обладают наибольшей связывающей способностью в отношении ЛПС грамотрицательных бактерий (до 4,9 нг на 1 г сорбента).
4. Полученные результаты позволяют рекомендовать модификацию ПС закрытого типа для дальнейших работ по созданию гемосорбента для удаления ЛПС из крови пациентов с сепсисом.

Литература

1. Кирковский, В. В. Экстракорпоральные методы коррекции гомеостаза. Гемодиализ. Плазмаферез. / В. В. Кирковский // Белорусский медицинский журнал. - 2004. - № 3. - С. 10-11.
2. Мухаев, Х. Х. Морфогенез тканей при использовании имплантантов из полисульфона в челюстно-лицевой области: специальность 14.00.15: автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата медицинских наук / Мухаев Хамит Хамзеевич. – Волгоград, 1995. – 33 с.
3. Tamura, H., Reich, J., Nagaoka, I. Outstanding Contributions of LAL Technology to Pharmaceutical and Medical Science: Review of Methods, Progress, Challenges, and Future Perspectives in Early Detection and Management of Bacterial Infections and Invasive Fungal Diseases. / H. Tamura, J. Reich, I. Nagaoka // Biomedicines. – 2021. – Vol.9, №5. – P. 536.
4. Ситников, А. Г. Методы проведения анализа / А. Г. Ситников // Бюллетень «ЛАЛ-тест». - 2005. - № 4. - С. 11.
5. Dolejš, P., Vaňousová, K. A collection of horseshoe crabs (Chelicerata: Xiphosura) in the National Museum, Prague (Czech Republic) and a review of their immunological importance / P. Dolejš, K. Vaňousová // Arachnologische Mitteilungen. - №49. – P. 1–9.