

*Бычко Г. Н., Кирковский В. В., Седёлкина Е. Л., Королик А. К., Лобачева Г. А.*

## **МЕТОДИКА КОЛИЧЕСТВЕННОЙ ОЦЕНКИ КОНЦЕНТРАЦИИ ЛИПОПОЛИСАХАРИДОВ ГРАММНЕГАТИВНОЙ ФЛОРЫ**

*УО «Белорусский государственный медицинский университет», г. Минск*

Бактериальные эндотоксины — липополисахариды (ЛПС) — составляют неперенную часть среды обитания человека и животных, постоянно образуются нормальной микрофлорой кишечного тракта. Они участвуют в дифференцировке различных клеток, например, иммунной системы, способны влиять на уровень и активность ферментов, вызывая значительные изменения метаболизма, процессов свертывания крови, активации комплемента и т. д. В случае развития патологического процесса и нарушении динамического равновесия между макро- и микроорганизмами, действие эндотоксина может приводить к тяжелым изменениям гемодинамики, включая шоковые состояния, значительно изменять температуру тела, вызывать адьювантный или иммуносупрессивный эффект, существенно влиять на резистентность к инфекциям и обеспечивать некроз опухолей. Присутствие ЛПС в парентеральных лекарственных препаратах и вакцинах создает опасность развития неблагоприятных реакций [1].

В этой связи количественная оценка уровня липополисахаридов имеет важное значение для разработки устройств, способных прочно связывать эти соединения, тем самым способствуя их элиминации из организма.

В настоящее время для количественного определения ЛПС используют биологические, серологические и химические методы. Распространенный способ выявления ЛПС по его пирогенному действию на кроликов имеет ограничения, связанные с воспроизводимостью, трудоемкостью и стоимостью. В последние годы широко применяют тест с лизатом амебоцитов *Limulus*, который при использовании коммерческих наборов прост и имеет высокую чувствительность. Однако его чувствительность не является абсолютной, а доступность ограничена стоимостью применяемых реагентов [2]. Серологическое определение ЛПС может быть довольно чувствительным. Акция торможения пассивной гемагглютинации выявляет 0,1–0,3 мкг/мл, но отражает не общее содержание эндотоксина, а лишь одного из множества ЛПС, различающихся по своей серологической специфичности.

Значительно более чувствительным и специфичным является определение ЛПС с карбоцианиновым красителем (КК), при котором взаимодействие КК с ЛПС приводит к появлению в его спектре дополнительного пика с максимумом поглощения в диапазоне 460–472 нм [3]. В то же время, взаимодействие с другими типами макромолекул (белками, полисахаридами и нуклеиновыми кислотами) вызывает совершенно иные изменения спектра. На этой основе может быть разработан метод количественного колориметрического определения ЛПС в условиях, которые обеспечивают его максимальную чувствительность, специфичность и воспроизводимость.

Определение основано на спектральном сдвиге в кислом растворе катионного карбоцианинового красителя. КК, максимально поглощая при 510 нм, претерпевает спектральный сдвиг в сторону более длинных волн при взаимодействии с полианионами — протеинами, нуклеиновыми кислотами, кислыми полисахаридами. Спектральные сдвиги в коротковолновую область, происходят при взаимодействии КК с липополисахаридами за счет специфического взаимодействия красителя с липидом А молекулы ЭТ. При взаимодействии красителя с очищенными препаратами из *E. coli* интенсивность поглощения при 510 нм снижается, а в области 460–480 нм возникает симметричный пик с максимумом при 460–465 нм. Постановка реакции с ЛПС из других источников также сопровождается спектральным сдвигом в коротковолновую область. Но положение адсорбционного максимума для каждого вида ЛПС будет несколько различаться. Метод чувствителен в диапазоне концентраций липополисахаридов (различного происхождения и состава) — 1–10 мкг/мл [3, 4].

Целью работы явилось изучение возможности использования данного метода для определения удельной сорбционной емкости разработанного гемосорбента «Липосорб».

В качестве модели использовали ЭТ *E. coli* следующих штаммов — 0,157:H7 (НИИЭиМ, РБ), 055:B5 (Fluka, USA), L-2880 (Sigma, USA), гидрогелевый гемосорбент «Липосорб», карбоцианиновый краситель (1-этил-2-[3-(1-этил-нафтол-[1,2-d]-тиоэтилен-2-)-2 метил пропенил]нафтол-[1,2 d] тиоэтилен бромид («Мерк», США)).

При количественном анализе ЛПС из различных источников, на первом этапе проведения анализа необходимо установить максимум в спектре поглощения

комплекса КК + ЛПС. Учет реакции окрашивания в пиковой точке спектра обеспечивает более высокую чувствительность измерения, чем учет в другой его области.

Как показали наши исследования, максимум спектральной кривой чистого карбоцианинового красителя приходится на 510 нм, а в комплексе с ЭТ из *E. coli* 0157:H7 (НИИЭиМ, РБ), и L-2880 (Sigma, USA) абсорбция сдвигается в коротковолновую область, максимально поглощая при 460 нм.

Для подтверждения универсальности и воспроизводимости данного метода было проведено исследование специфичности связывания и спектральные сдвиги КК с очищенным ЭТ из *E. coli* O55:B5 (Sigma, USA). Оказалось, что спектральное распределение комплекса КК с *E. coli* O55:B5 так же сдвигается в коротковолновую область, но максимум поглощения в этом случае регистрируется уже при 465 нм.

В целях оценки эффективности предложенной методики было проведено определение сорбционной емкости разработанного в Республике Беларусь ЛПС-сорбента («Липосорб»). Методика эксперимента состояла в следующем.

Сорбент извлекался из корпуса массообменника, промывался 0,9 % раствором натрия хлорида и измерялся его объем. Максимально удалялась промывная жидкость, гемосорбент подсушивался на фильтре. Готовился раствор эндотоксина *E. coli* 0157:H7 в концентрации 10 мкг/мл. Подготовленный к работе сорбент (25,0 мл) смешивали с раствором *E. coli* 0157:H7 (50,0 мл с концентрацией 10 мкг/мл). Отбиралась проба соответствующая нулевой (сразу после смешивания) и конечной точке инкубации. С каждой из отобранных проб ставили реакцию с КК. Сорбционная емкость сорбента рассчитывается по разности ОП<sub>460</sub> нулевой точки инкубации и ОП<sub>460</sub> спустя 60 мин экспозиции ЭТ + ЛПС-сорбент. По калибровочному графику находили концентрацию ЭТ, соответствующую разности ОП<sub>460</sub> начальной и конечной точек инкубации и рассчитывают количество мкг ЭТ сорбированного на мл сорбента.

Удельную сорбционную емкость биоспецифического полиакриламидного гидрогеля (УСЕ) рассчитывали по формуле:

$$\text{УСЕ (мкг/мл)} = C_{\text{ЭТ}} \times V_{\text{ЭТ}}/V,$$

где  $C_{\text{ЭТ}}$  — концентрация эндотоксина, связавшегося с биоспецифическим полиакриламидным гелем;  $V_{\text{ЭТ}}$  — объем рабочего раствора эндотоксина, равный 50 мл;  $V$  — объем биоспецифического полиакриламидного геля, равный 25 мл.

С применением данной методики была оценена сорбционная емкость нескольких серий гемосорбента «Липосорб», показавших, что данный сорбционный материал способен удерживать ЭТ из раствора до 8–10 мкг/мл геля.

Взаимодействие карбоцианинового красителя с липополисахаридами из различных источников ведет к появлению адсорбционного максимума в области 460–465 нм, точное положение которого зависит от природы липополисахарида. Применение данного метода позволяет с высокой точностью и воспроизводимостью определять удельную сорбционную емкость разработанного в Белоруссии биоспецифического гидрогелевого сорбента «Липосорб».

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Егорова, Т. П. Применение колориметрического метода определения липополисахарида в иммунологических исследованиях / Т. П. Егорова, Е. П. Глебовская, В. И. Левенсон // Иммунология. 1988. № 4. С. 79–82.

2. *Elin, R. J., Woell S. // J. Infect. Dis. 1973. Vol. 33. P. 349–352.*
3. *Janda, J. A colorimetric estimation of lipopolysaccharides / J. Janda, E. Work // FEBS Letter. 1971. Vol. 1, N 16 (4). P. 343–345.*
4. *Zey, P., Juckson S. // Appl. Microbiol. 1973. Vol. 26. P. 129–133.*