

DOI: 10.5862/JPM.218.9

УДК 615.012.8

*Н.В. Скворцов¹, О.Л. Власова²,
А.Г. Болдырев¹, И.В. Ларионов¹*¹ ГосНИИ особо чистых биопрепаратов² Санкт-Петербургский политехнический
университет Петра Великого

ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ СОРБЕНТА СФЕРОЦЕЛЛ С80 В ДИНАМИЧЕСКОМ РЕЖИМЕ

Реализованы процессы адсорбционного связывания эндотоксина из физиологического и альбуминсодержащего растворов с помощью сорбента Сфероцелл С80. Оценены его гидродинамические характеристики и сорбционные свойства при связывании эндотоксина в динамическом режиме из модельных сред. Показано, что Сфероцелл С80 по своим гидродинамическим и емкостным характеристикам удовлетворяет как процессам финишной очистки биопрепаратов, так и процессу гемосорбции.

СОРБЕНТ, ЭНДОТОКСИН, БИОПРЕПАРАТЫ, ГЕМОСОРБЦИЯ.

В XXI веке одной из актуальных проблем современной медицины остается лечение сепсиса. По данным исследований, проводившихся в двадцати странах мира, наблюдается тенденция к росту частоты заболеваний и возникновению инфекционно-септических осложнений со стабильно высокой летальностью. Несмотря на прогресс в соответствующей области знаний, который проявляется во внедрении в лечебную практику новых антибактериальных препаратов с широким спектром действия, в развитии современных представлений в сфере реаниматологии и интенсивной терапии, в совершенствовании методик экстракорпоральной гемокоррекции, сепсис и септический шок остаются по-прежнему основными причинами смерти пациентов во всем мире. Течение сепсиса в 58 % случаев завершается септическим шоком, и летальность при септических состояниях составляет, по данным различных авторов, 20 – 50 % [1].

В качестве главного фактора, определяющего развитие шоковых состояний и, далее, полиорганной недостаточности, выступает появление в кровяном русле эндотоксина. Радикальный путь борьбы с этим состоянием – элиминация этого компонента в кровотоке.

По своей химической природе эндотоксин представляет собой липополисахарид (ЛПС). Это структурный элемент бактериальной стенки грамотрицательных бактерий. Ричард Пфайфер в 1892 году определил биологическое действие открытого им эндотоксина. Практически все звенья гомеостаза прямым или косвенным образом атакуются этим токсичным веществом. Циркулируя в кровотоке, оно активирует множество биологических защитных систем. В результате активации последних возникает тяжелая воспалительная реакция, с дальнейшим формированием полиорганной недостаточности. Высокая биологическая активность ЛПС бактериальной

стенки вызывает тяжелые осложнения в результате интоксикации организма.

В качестве факторов, способствующих развитию системной эндотоксинемии, медики выделяют антибактериальную терапию с применением препаратов бактерицидного действия; повреждение естественных защитных барьеров; замедление и шунтирование портального кровотока, приводящие к недостаточности детоксицирующей функции печени; повреждение элиминационных функций почек и легких. Формирующаяся системная эндотоксинемия является мощным стимулятором генерализованной тяжелой воспалительной реакции. На этом фоне селективное удаление эндотоксина из крови представляется крайне перспективной процедурой, способной прекратить или, по крайней мере, ослабить стимуляцию выработки воспалительных медиаторов [2].

В России имеется опыт лишь единичных процедур плазмафереза с использованием селективных колонок для связывания эндотоксина у тяжелой категории больных с инфекционно-септическими осложнениями [3]. Такие процессы реализуются с помощью специальной аппаратуры и сорбентов зарубежных фирм. Отечественные разработки в настоящее время неконкурентоспособны в связи с их низкой эффективностью.

Все вышеизложенное дает основание полагать, что разработка высокоэффективных сорбентов для элиминации эндотоксинов представляет собой актуальную задачу.

Цель данного исследования – оценка эффективности гемосовместимого сорбента для элиминации эндотоксина (Сфероцелл С80) в белковых препаратах терапевтического применения и плазме крови. И, в связи с этим, изучение кинетики и динамики взаимодействия эндотоксина с гидрофобными сорбентами различной структурной организации, с таким расчетом, чтобы разработать сорбционный метод элиминации эндотоксина.

По физиологическому действию эндотоксин относится к группе пирогенов – соединений, вызывающих пирогенные эффекты (лихорадку). По химической структуре эндотоксин представляет собой олигомер, в состав которого входят три различных по составу и функциональному поведению фрагмента: липидный участок (липид А), 0-полисахарид (0-антиген) и олигосахарид, их соединяющий (рис. 1) [4].

Существенными для процесса элиминации ЛПС являются жесткие требования к его остаточной концентрации. Фармакопеи Всемирной организации здравоохранения требуют лимитировать содержание эндотоксина в лекарственных формах внутривенного применения пределом

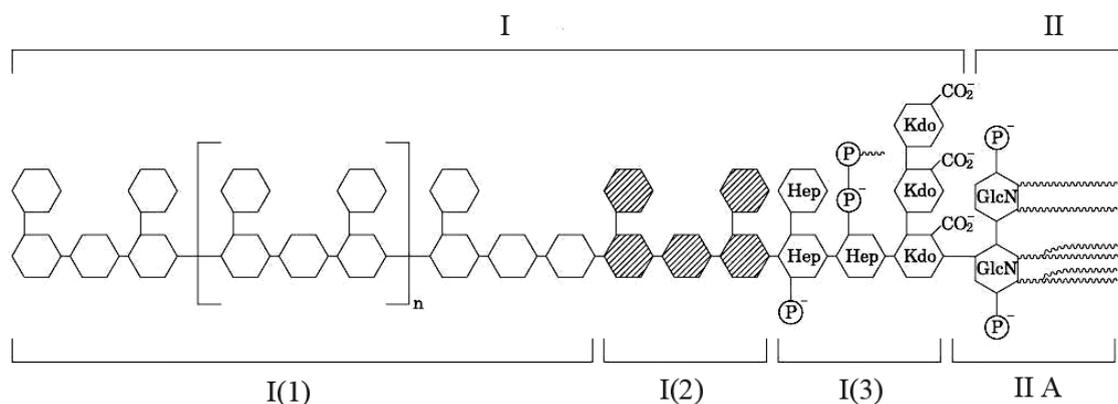


Рис. 1. Схематическая структура бактериального липополисахарида:

Hep – гептоза; Kdo – 2-кето-3-деоксиоктоновая кислота; GlcN – N-ацетилглюкозамин; P – фосфат; I, II – полисахаридная и липидная составляющие; I (1) – O-специфическая цепь (высоковариабельный участок); I (2) – внешнее ядро (умеренно вариабельный участок); I (3) – внутреннее ядро (низковариабельный участок); II A – липид А (почти невариабельный участок)



0,05 ppm (млн^{-1}). Согласно [5], превышение этого предела в препарате может приводить к развитию септического шока у пациентов.

Сопоставительный анализ современных методов элиминации с точки зрения минимальной остаточной величины концентрации целевого компонента (ЛПС) показывает, что наилучшего результата можно достичь в рамках применения адсорбционного метода. В случае использования эфферентной терапии, многократное повторение элементарного акта сорбции оказывается естественным образом включенным в терапевтическую процедуру [6].

Таким образом, магистральным путем решения сформулированной задачи является создание селективного высокоэффективного (с очень высоким значением равновесного коэффициента распределения (КР)) сорбента для связывания эндотоксина. При этом также важен выбор матрицы носителя для корректной иммобилизации и доступности аффинанта и реализации эффективного внутридиффузионного переноса ЛПС.

Поблочное рассмотрение структуры молекулы ЛПС показывает следующее:

О-специфическая (гидратируемая) часть абсолютно бесперспективна в плане эффективности адсорбционного связывания;

ядерная часть адсорбционно активна, но не обладает достаточной степенью селективности и способна обеспечить $\text{КР} \leq 5$;

липидная часть (невариабильный участок) в гидрофильных биологических системах, напротив, представляется в высшей степени специфичной и пригодной для селективного связывания ЛПС. К аналогичному выводу пришли авторы статьи [7], которые провели компьютерное моделирование процесса сорбции.

В качестве экспериментального гидрофобного сорбента использовался синтезированный в ходе выполнения работы сорбент Сфероцелл С80 на основе регенерированной целлюлозы (микросферическая форма, макропористый вариант). Гидрофобные радикалы, выбранные в качестве

аффинантов, по существу представляют собой функциональный аналог алифатического фрагмента молекулы ЛПС и потому характеризуются повышенным сродством к этому фрагменту.

Как показано в работе [8], кратность снижения равновесной концентрации ЛПС в физиологическом растворе в интервале исходных концентраций 10 – 10 000 нг/мл в КР для данного сорбента находится в диапазоне 1 800 – 3 000. Однако в тех же условиях, в присутствии 10 %-го альбумина, кратность понижается до уровня 50 – 280. По-видимому, таким образом проявляется конкуренция сорбатов за центры сорбции. Максимальная емкость сорбента по ЛПС в условиях конкуренции с альбумином превосходит 37 000 нг/мл сорбента. Величина КР позволяет оценить степень понижения содержания ЛПС в модельной среде, в том числе предельную; емкость – эффективность применения сорбента при очень высоких концентрациях ЛПС в средах.

Эксперименты показали, что при хроматографии на Сфероцелле С80 потери базового белка не превосходят 5 % [8], в то время как соответствующие потери в процессах с использованием сорбента Полимиксин Б сефарозы составляют более 25 % [4].

Одна из важнейших эксплуатационных характеристик сорбента – это его гидродинамическая жесткость, ограничивающая скорость потока в хроматографических процессах (что особенно существенно для процессов гемосорбции). Поэтому в работе изучали гидродинамическое сопротивление сорбента. Помимо этого, контролировали состояние гранул матрицы сорбента Сфероцелл после динамического процесса. Гидродинамические характеристики сорбента определяли в экспериментах *in vitro* с использованием массообменного устройства фирмы «Покард». Экспериментальные результаты представлены на рис. 2.

Линейная скорость перфузии определялась по величине объемной скорости фильтрации с учетом сечения колонки; она составила 30 мл/см². Для определения максимально возможной скорости перфу-

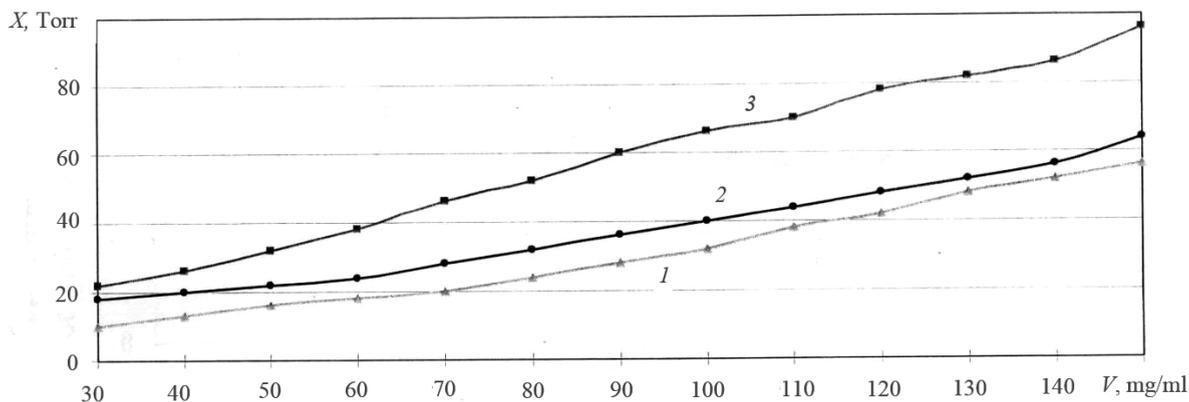


Рис. 2. Гидродинамические характеристики сорбента в экспериментах *in vitro*, полученные при перфузии 0,9 %-го раствора NaCl при различных значениях гидродинамического коэффициента, Торг: 0,33 (1), 0, 43 (2), 0,65 (3).
Условия эксперимента: 1 – пустая колонка; 2, 3 – колонка с сорбентом, перфузия сверху вниз и снизу вверх, соответственно

зии сорбент Сфероцелл С80 (фракционный состав – 500 – 800 мкм) загружали в стеклянную колонку объемом 50 мл и пропускали 0,9 %-й раствор NaCl на скоростях 100 – 400 мл/мин. При значениях до 300 мл/мин наблюдался равномерный поток раствора, при повышении же скорости свыше 300 мл/мин равномерность нарушалась: поток сохранялся по величине, но возникали пульсации, что свидетельствует о переходе к нестационарному режиму течения. Таким образом экспериментально установлено, что сорбент обладает приемлемыми гидродинамическими характеристиками в диапазоне скоростей 0 – 300 мл/мин.

Поскольку в дальнейшем предполагается использование сорбента в неньютоновских жидкостях (плазма крови), особое внимание уделялось анализу его деформационно-прочностных характеристик. После извлечения сорбента из колонки образцы были изучены под микроскопом для выявления деформации и разрушения зерен сорбента. Констатировали отсутствие деформированных и разрушенных гранул.

Особенность поровой структуры носителя Сфероцелл состоит в бимодальном распределении пор по размерам. Для него характерны как поры с размером 0,1 – 3,0 мкм (транспортные поры), так и «хроматографические поры» с размерами 5 – 30 нм, при этом каждый тип пор дает определен-

ный удельный вклад в суммарный объем порового пространства: 0,8 – 0,9 для транспортных пор и 0,35 – 0,40 для пор хроматографического масштаба [8].

Ввиду большого количества транспортных пор, сорбент обеспечивает эффективный массоперенос в каждом зерне для крупномолекулярных объектов, а гидрофобные аффинанты конкурентным образом разрушают ассоциаты ЛПС. Такая структура носителя позволяет эффективно сорбировать молекулярные компоненты в широком интервале размеров: от индивидуальных молекул до крупномасштабных ассоциатов без потери емкости сорбента; эта характеристика существенна при работе с крупномасштабными субстратами, в частности, с ассоциирующимся ЛПС.

Динамические характеристики взаимодействия эндотоксина с гидрофобным сорбентом оценивали с использованием лабораторных колонок различного размера. Исследовали влияние скорости и времени перфузии на эффективность связывания ЛПС гидрофобным сорбентом Сфероцелл С80.

В рамках этих экспериментов 20 мл сорбента Сфероцелл С80 (фракция 125 – 315 мкм) помещали в хроматографическую колонку. Через нее в режиме рециркуляции пропускали водный раствор эндотоксина с концентрацией 10 нг/мл в течение полутора

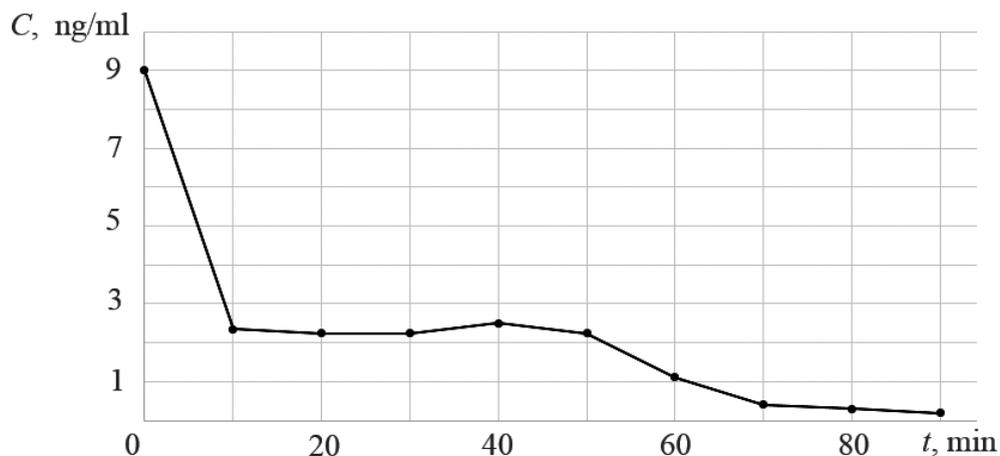


Рис. 3. Зависимость концентрации эндотоксина (ЛПС) на выходе хроматографической колонки от времени перфузии водного раствора эндотоксина (10 нг/мл) через сорбент Сфероцелл С80; скорость 1 мл/с

часов, на скорости 1 мл/с (60 мл/мин) общим объемом 500 мл. В ходе эксперимента через каждые 10 мин отбирали пробы по 100 мкл для анализа. В отобранных пробах хромогенным тестом LAL [9] определяли содержание эндотоксина. Результаты описанного эксперимента приведены на рис. 3. Видно, что концентрация эндотоксина снизилась более чем в 40 раз.

Исследования, направленные на оценку сорбции эндотоксина в условиях конку-

ренции с сывороточным альбумином проводили с помощью хроматографической колонки объемом 5 мл, заполненной 2 мл сорбента крупной фракции (500 мкм). Через нее пропускали 500 мл раствора эндотоксина в концентрации 100 нг/мл в 10 %-м сывороточном альбумине человека. Поток обеспечивался перистальтическим насосом. Скорость потока выбиралась исходя из требований к процессу экстракорпоральной гемокоррекции (120 мл/мин). Опыт про-

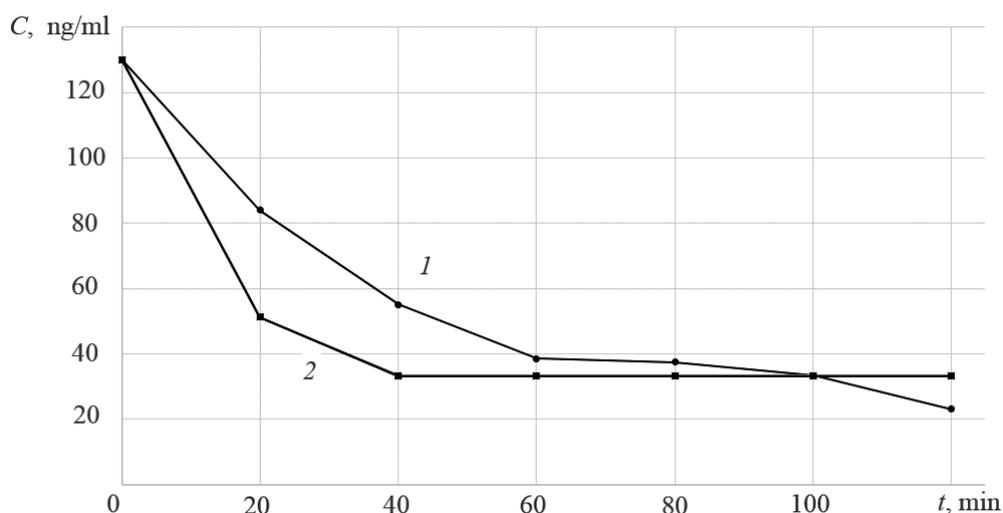


Рис. 4. Сравнение эффективностей сорбента С80 (1) и гемосорбента на основе ПС-ДВБ (2) по динамике перфузии раствора смеси эндотоксина с сывороточным альбумином (100 нг/мл + 10 %). Представлены зависимости, аналогичные приведенной на рис. 3

дили при постоянной температуре. Пробы для анализа отбирали каждые 20 мин в течение двух часов. Количество эндотоксина в отобранных пробах определяли хромогенным тестом LAL [9]. Результаты приведены на рис. 4 (кривая 1). Анализ полученных результатов показал, что по истечении 120 мин перфузии концентрация эндотоксина в пробе снизилась в 5,7 раза, по сравнению с исходной.

Сравнительный эксперимент с использованием макропористого гидрофобного гемосорбента отечественной разработки на основе полистиролдивинилбензола (ПС-ДВБ), проведенный аналогичным образом, показал, что концентрация ЛПС в пробе за два часа перфузии снижается лишь в 3,9 раза (рис. 4, кривая 2).

В результате проведенного исследования показано, что при использовании сорбента

Сфероцелл С80 в ходе сорбционного процесса, реализованного в режиме, характерном для финишной очистки биопрепаратов генно-инженерного генеза, концентрация липополисахарида снижается в 40 раз, тогда как в ходе такого процесса, реализованного в режиме, характерном для процессов гемосорбции, концентрация липополисахарида снижается более чем в 5 раз.

Таким образом, реализованный процесс показывает, что сорбент Сфероцелл С80 в силу своих селективных, емкостных и гидродинамических характеристик с успехом обеспечивает переход к динамическому режиму и по эффективности элиминации ЛПС не уступает конвенциональным сорбентам, обеспечивая при этом необходимый уровень элиминации ЛПС как в биопрепаратах, так и в биологических жидкостях.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

[1] **Зулькарнаев А.Б.** Селективная сорбция эндотоксина грамотрицательных бактерий при хирургическом сепсисе. Автореф. дис. ... канд. мед. наук. Москва, 2010.

[2] **Яковлев М.Ю.** Кишечный липополисахарид: системная эндотоксинемия – эндотоксиновая агрессия – SIR-синдром и полиорганная недостаточность как звенья одной цепи // Бюлл. ВНИЦ РАМН. 2005. № 1. С. 15–18.

[3] **Ярустовский М.Б.** Современные методы экстракорпоральной терапии в комплексном лечении сепсиса // Интенсивная терапия. 2008. № 1. С. 6–10.

[4] **Гусаров Д.А.** Способы очистки биофармацевтических белков от эндотоксинов клеточной стенки // Биофармацевтический журнал. 2009. Т. 1. № 3. С. 10–17.

[5] Комитет экспертов ВОЗ по стандартизации биологических препаратов: сорок шестой доклад: пер. с англ. Всемирная организация

здравоохранения, Комитет экспертов. Женева: ВОЗ, 1998. 120 с.

[6] **Ronco C., Piccini P., Rosner M.H.** (eds). Ebdotoxemia and Endotoxin Shock: Disease, Diagnosis and Therapy// Contrib. Nephrol. 2010. Vol. 167. Pp. 25–34.

[7] **Ronco C., Piccini P., Rosner M.H.** (eds). Ebdotoxemia and Endotoxin Shock: Disease, Diagnosis and Therapy// Contrib. Nephrol. 2010. Vol. 167. Pp. 45–54.

[8] **Скворцов Н.В., Самойлов В.О., Ларионов И.В., Болдырев А.Г.** Эффективный сорбент для элиминации эндотоксина в биопрепаратах генно-инженерного генеза и биологических жидкостях // Научно-технические ведомости СПбГПУ. Физико-математические науки. 2013. № 3(177). С. 177–181.

[9] Associates of Cape Cod, Inc. Описание фирменного LAL теста и инструкция по работе с ним.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

СКВОРЦОВ Никита Владиславович – научный сотрудник Государственного научно-исследовательского института особо чистых биопрепаратов.

197110, Российская Федерация, г. Санкт-Петербург, Пудожская ул., 7
aelu@yandex.ru

ВЛАСОВА Ольга Леонардовна – доктор физико-математических наук, заместитель заведующего кафедрой медицинской физики Санкт-Петербургского политехнического университета Петра Великого.

195251, Российская Федерация, г. Санкт-Петербург, Политехническая ул., 29
olvlasova@yandex.ru

БОЛДЫРЕВ Александр Георгиевич – кандидат физико-математических наук, научный консультант Государственного научно-исследовательского института особо чистых биопрепаратов.

197110, Российская Федерация, г. Санкт-Петербург, Пудожская ул., 7

Doc.Boldyrev@yandex.ru

ЛАРИОНОВ Иван Владимирович – начальник лаборатории медицинских нанотехнологий Государственного научно-исследовательского института особо чистых биопрепаратов.

197110, Российская Федерация, г. Санкт-Петербург, Пудожская ул., 7

larionov_ivanvl@mail.ru

Skvortsov N.S., Vlasova O.L., Boldyrev A.G., Larionov I.V. PERFORMANCE EVALUATION OF SFEROCELL S80 SORBENT IN THE DYNAMIC MODE.

The crucial factor of septic shock and subsequent multiple organ failure is the contamination of circulating blood with a bacterial endotoxin. The most straightforward approach to mitigating this condition is to remove the endotoxin from the bloodstream.

The hydrophobic Spherocel S80 sorbent has been used as an experimental one in the present work. It was synthesized on the basis of regenerated cellulose. The dynamic characteristics of endotoxin interactions with the hydrophobic sorbent under flow conditions were studied using chromatographic columns of different sizes. The effects of the rate and perfusion duration on LPS binding by Spherocel S80 were evaluated. The endotoxin quantity in every taken sample of the perfusate was determined through a chromogenic LAL test.

The implemented process showed that the sorbent Spherocel S80 proved successful under flow conditions due to its selective, capacitive, and hydrodynamic characteristics. Moreover, the sorbent was as efficient in LPS elimination as the conventional ones, ensuring the required degree of LPS elimination both in biotechnological preparations and biological liquids.

SORBENT, ELIMINATION, ENDOTOXIN, BIOLOGICAL PRODUCTS, HEMOSORPTION.

REFERENCES

- [1] **A.B. Zul'karnaev**, Selektivnaya sorbtsiya endotoksina gramotritsatel'nykh bakterij pri khirurgicheskom sepsise. Avtoref. dis. ... kand. med. nauk [Selective adsorption of gram-negative bacteria endotoxin during surgical sepsis]. Moscow, 2010.
- [2] **M.Yu. Yakovlev**, Kishhechnyj lipopolisakharid: sistemnaya endotoksinemiya – endotoksinovaya agressiya – SIR – sindrom i poliorgannaya nedostatochnost', kak zven'ya odnoj tsepi [Intestinal lipopolysaccharide: systemic endotoxemia – endotoxin aggression – SIR-syndrome and multiple organ failure as links in a chain], Byull. VNTs RAMN. 1 (2005) 15–18.
- [3] **M.B. Yarustovsky**, Sovremennye metody ekstrakorporal'noj terapii v kompleksnom lechenii sepsisa [Modern methods of extracorporeal therapy in treatment of sepsis], Intensive Care Journal. 1 (2008) 6–10.
- [4] **D.A. Gusarov**, Methods of bacterial endotoxines removal from protein solutions, Russian Journal of Biopharmaceuticals. 1 (3) (2009) 10–17.
- [5] WHO Expert committee on biological standardization technical report series: 46th report: Number 872. WHO, Geneva, 1998.
- [6] **C. Ronco, P. Piccini, M.H. Rosner**, Ebdotoxemia and Endotoxin Shock: Disease, Diagnosis and Therapy. Contrib. Nephrol. 167 (2010) 25–34.
- [7] **C. Ronco, P. Piccini, M.H. Rosner**, Ebdotoxemia and Endotoxin Shock: Disease, Diagnosis and Therapy. Contrib. Nephrol. 167 (2010) 45–54.
- [8] **N.V. Skvortsov, V.O. Samoilov, I.V. Larionov, A.G. Boldyrev**, An effective sorbent for elimination endotoxin in biological products of genetically engineered genesis and biological liquids, St. Petersburg State Polytechnical University Journal: Physics and Mathematics. 3(177) (2013) 177–181.
- [9] Associates of Cape Cod, Inc. LAL Methodology & Applications. Available at: <http://www.acciusa.com/lal/index.html>.

THE AUTHORS

SKVORTSOV Nikita S.

State Research Institute of Pure Biochemicals

7, Pudozhskaya St., St. Petersburg, 197110, Russian Federation

aelu@yandex.ru

VLASOVA Olga L.

Peter the Great St. Petersburg Polytechnic University
29, Politekhnikeskaya St., St. Petersburg, 195251, Russian Federation
olvlasova@yandex.ru

BOLDYREV Alexander G.

State Research Institute of Pure Biochemicals
7, Pudozhskaya St., St. Petersburg, 197110, Russian Federation
Doc.Boldyrev@yandex.ru

LARIONOV Ivan V.

State Research Institute of Pure Biochemicals
7, Pudozhskaya St., St. Petersburg, 197110, Russian Federation
larionov_ivanvl@mail.ru