

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ И ТЕОРЕТИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ АНТИМИКРОБНЫХ СВОЙСТВ КАТИОННЫХ ФТАЛОЦИАНИНОВ

И.Б. Коваленко^{1,2}, М.Г. Страховская^{1,2}, С.Ю. Коваленко¹, Т.В. Галочкина^{1,2},
Д.В. Зленко², А.М. Нестеренко³, А.В. Аверьянов¹

¹ФНКЦ специализированных видов медицинской помощи и медицинских технологий ФМБА России

²Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, биологический факультет

³Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, НИИ физико-химической биологии

Статья посвящена работе лаборатории молекулярного моделирования и биоинформатики ФНКЦ ФМБА России. Рассматриваются вопросы фотодинамической инактивации бактерий, изучения электростатического взаимодействия катионных фталоцианинов с липополисахаридами – эндотоксинами грам-отрицательных бактерий, сорбционные свойства гетерогенных катионных фталоцианинов в отношении липополисахаридов. Также обсуждается компьютерное моделирование наружной мембраны грам-отрицательной бактерии и молекул фталоцианина.

Ключевые слова: фотодинамическая инактивация, фотосенсибилизатор, активные формы кислорода, эндотоксин – липополисахарид, сепсис, сорбент, фталоцианины, электростатическое взаимодействие, компьютерное моделирование

EXPERIMENTAL AND THEORETICAL STUDY OF ANTIMICROBIAL PROPERTIES OF CATIONIC PHTHALOCYANINES

Kovalenko I.B., Strakhovskaya M.G., Kovalenko S.Yu., Galochkina T.V., Averyanov A.V.

The article is devoted to the work of the laboratory of molecular modeling and bioinformatics of Federal Scientific and Clinical Center of FMBA of Russia. The problems of photodynamic inactivation of bacteria, examining electrostatic interaction of the cationic phthalocyanines with lipopolysaccharides – endotoxins of gram-negative bacteria, the sorption properties of heterogeneous cationic phthalocyanines against lipopolysaccharides are discussed. Computer simulation of the outer membrane of Gram-negative bacteria and phthalocyanine molecules is also discussed.

Key words: photodynamic inactivation, photosensitizer, reactive oxygen species, endotoxin – lipopolysaccharide, sepsis, sorbent, phthalocyanines, electrostatic interaction, computer model

Лаборатория молекулярного моделирования и биоинформатики, организованная в ФНКЦ ФМБА России в 2012 году, ведет научную деятельность по нескольким направлениям. Одним из приоритетных направлений деятельности является исследование антимикробных свойств катионных макро-

циклических соединений, включая фотосенсибилизирующие свойства, взаимодействие с микробными клетками-мишенями и компонентами их клеточных стенок, в том числе – исследование строения самих микробных клеточных стенок методами молекулярного моделирования.

1. Фотодинамическая инактивация бактерий, опосредованная катионными фталоцианинами

Наращение резистентности бактерий к уже имеющимся препаратам и дефицит структур, которые потенциально могли бы лечь в основу новых дезинфектантов и антибиотиков, поставили на повестку дня поиск альтернативных способов борьбы с патогенными микроорганизмами. Одной из возможных альтернатив является фотосенсибилизированная инактивация бактериальных и грибковых заражений, опосредованная активными формами кислорода (АФК). Одним из инновационных способов борьбы с возбудителями инфекций является метод фотодинамической инактивации, основанный на обработке участка зараженной поверхности красителем – фотосенсибилизатором (ФС), обладающим сродством к микробным клеткам. Суть метода состоит в том, что ФС при воздействии видимого или инфракрасного света с длинами волн, соответствующими спектру их поглощения, генерирует образование цитотоксических АФК, вызывающих окислительную деструкцию различных структур микробных клеток. В отличие от антибиотиков, каждый из которых специфически воздействует на определенную мишень в микробной клетке: клеточную стенку, цитоплазматическую мембрану, репликацию ДНК, транскрипцию или трансляцию белков, генерируемые ФС АФК вызывают окислительное повреждение компонентов как липидной, так и белковой природы, а также нуклеиновых кислот. Считается, что такой множественный окислительный характер повреждений клеточных компонентов препятствует развитию микробной резистентности, в связи с чем этот метод рассматривается как перспективный способ борьбы с возбудителями заболеваний, устойчивыми к действию традиционных препаратов.

В результате интенсивных исследований, проводимых в мире в течение последних 20 лет (в среднем около 200 публикаций в год только по антибактериальной активности ФС) достигнуты значительные успехи. Однако, несмотря на очевидные достижения, создание новых структур ФС для фотодинамической инактивации микроорганизмов представляет актуальную задачу. Основными направлениями оптимизации структур и свойств ФС явля-

ются улучшение фотофизических параметров, и за счет этого – снижение доз действующего света, создание ФС с поглощением в дальней красной или, особенно, ближней инфракрасной области, достижение высокой селективности к микробным клеткам-мишеням по отношению к нормальным тканям организма.

Условием эффективной фотодинамической инактивации (ФДИ) является тесная ассоциация ФС с биологической мишенью, что следует из малого (10-50 нм) диффузионного радиуса АФК в биологической среде. Введение в структуру молекул ФС катионных заместителей позволяет достичь высокой эффективности связывания молекул ФС по электростатическому механизму (рис. 1) с отрицательно заряженной поверхностью микробных клеток, а значит, и специфичности фотодинамического воздействия [1]. Применяемые в нашей работе инновационные катионные ФС из класса тетрапиррольных макроциклов (фталоцианины, хлорины и бактериохлорины) обладают высокой эффективностью и широким спектром антимикробной активности, в том числе – в отношении биопленок [2]. Внедрение фотосенсибилизаторов и технологий фотодинамической терапии и обеззараживания в медицинскую практику послужит повышению эффективности борьбы с микробной резистентностью.

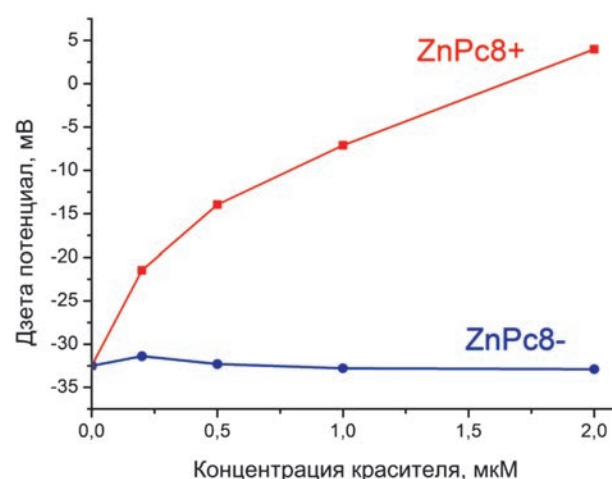


Рис. 1. Зависимость поверхностного заряда (дзета потенциала) клеток бактерий *Escherichia coli* (30 млн КОЕ/мл в 1,4 мМ NaCl) от концентрации фталоцианина, молекулы которого несут 8 отрицательно (ZnPc8-) или положительно (ZnPc8+) заряженных боковых заместителей. Измерения дзета потенциала проводили на Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Worcestershire, UK). Красители синтезированы в ФГУП ГИЦ «НИОПИК».

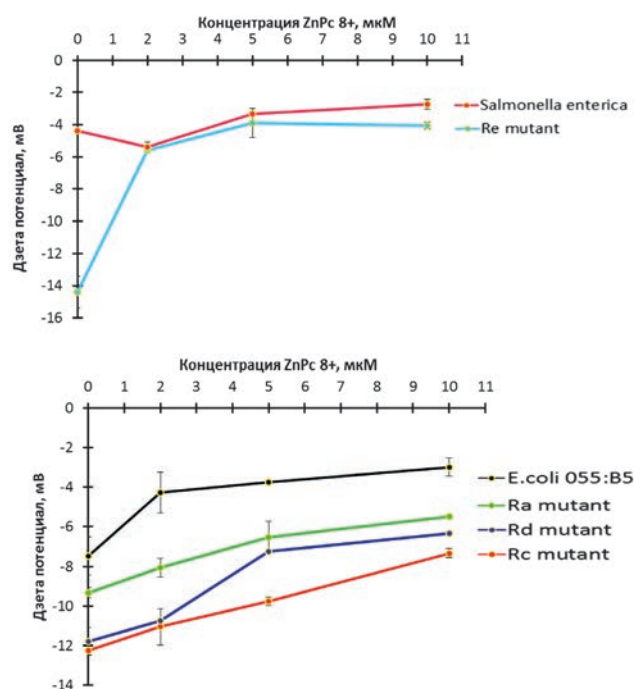


Рис. 2. Зависимость дзета потенциала мицелл ЛПС (50 мкг/мл) в 10мМ PBS от концентраций ZnPc8+. Измерения дзета потенциала проводили на Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Worcestershire, UK). ЛПС, выделенные из различных штаммов бактерий (Sigma), растворяли в 10 мМ буфере PBS, содержащем 137 мМ NaCl и 2,7 мМ KCl, pH 7,4, путем интенсивного перемешивания 1 час при 37°C на качалке при 120 оборотах в минуту, нагревали 10 мин при 60°C, повторно перемешивали в течение 1 час при 37°C на качалке при 120 оборотах в минуту и выдерживали не менее 12 ч при 4°C перед проведением эксперимента.

2. Исследование электростатического взаимодействия катионных фталоцианинов с липополисахаридами – эндотоксинами грам-отрицательных бактерий

По химическому строению эндотоксины относятся к липополисахаридам (ЛПС) и являются основным компонентом наружной мембраны, входящей в состав клеточной стенки грамотрицательных бактерий. Так, одна клетка *Escherichia coli* содержит 2-3 млн молекул ЛПС. При разрушении бактериальных клеток ЛПС выделяются в окружающую среду, формируя в водной среде агрегатные формы. ЛПС сочетают в пределах одной макромолекулы гидрофильный и гидрофобный фрагменты. Гидрофильный фрагмент молекулы ЛПС несет отрицательный заряд, который обуславливает ее высокое сродство с катионными соединениями. Нами было обнаружено, что поликатионные металлофталоцианины эффективно связываются по электростатическому механизму не только с целыми бактериальными клетками, но и с ЛПС, высвободившимися из

бактериальных клеток в окружающую среду. При этом происходит нейтрализация отрицательных зарядов на молекулах ЛПС положительными зарядами в молекулах металлофталоцианинов [3]. Отрицательно заряженные сахара преимущественно входят в коровую часть ЛПС, состав и размер которой у различных видов бактерий сильно варьирует. Нами исследовано влияние размера коровой части на связывание поликатионного фталоцианина с ЛПС. Эти эксперименты проводили с использованием ЛПС из мутантных штаммов без О-антигенной цепи - Re, Rd, Rc, Ra формы, характеризующихся последовательным увеличением коровой цепи. Показано, что наибольший эффект нейтрализации дзета потенциала наблюдается на мицеллах из Re-формы ЛПС, для которой характерно полное отсутствие О-антигенной цепи (рис. 2).

3. Исследование сорбционных свойств гетерогенных катионных фталоцианинов в отношении липополисахаридов - эндотоксинов грам-отрицательных бактерий

Основными требованиями к инфузионным растворам является стерильность и апиrogenность. Пирогенные реакции или лихорадочные состояния вызываются при попадании в кровяное русло вместе с трансфузионной средой пирогенов, важнейшими из которых являются эндотоксины грам-отрицательных бактерий. Предельно допустимое содержание бактериальных эндотоксинов в воде для инъекций, установленное Фармакопеей многих стран, в том числе РФ, составляет 0,25 единиц эндотоксина в мл (0,25 EU/мл). В питьевой воде, для сравнения, содержится более 2 EU/мл эндотоксинов. При приготовлении инфузионных растворов вода является основным источником эндотоксинов, поэтому разработка способов удаления эндотоксинов из воды является актуальной задачей биотехнологии и медицины. Использование больших объемов плазмозамещающих растворов создает условия для попадания в организм большого значительных количеств эндотоксинов, способных вызвать пирогенную реакцию. В этой связи возникает необходимость очистки солевых растворов, изотоничных плазме крови, от эндотоксинов.

Для изучения эффективности связывания эндотоксинов, выделенных из клеточных сте-

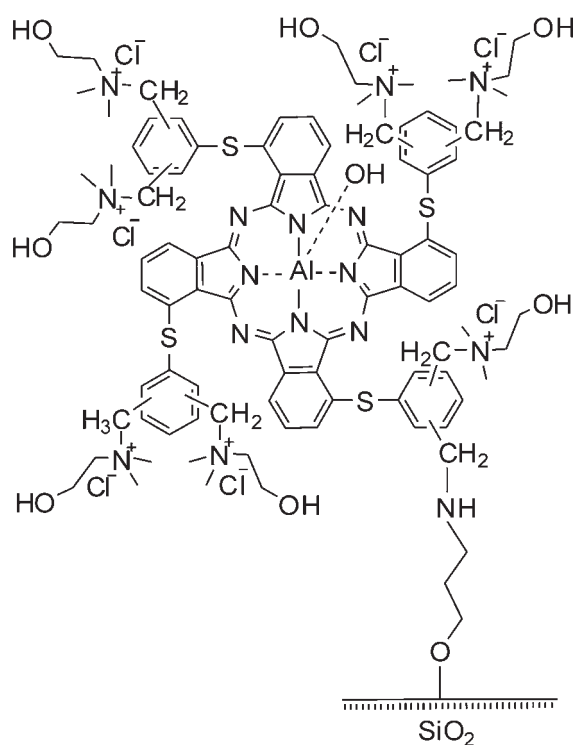


Рис. 3. Структурная формула сорбента с ковалентно привитым поликатионным металлофталоцианином (синтезирован в ФГУП ГНЦ «НИО-ПИК»).

нок грам-отрицательных бактерий, использовали гетерогенные поликатионные металлофталоцианины, ковалентно пришитые (5 мкМ/г) к аминопропилированному силикагелю с размером пор 25 нм (рис. 3). Поскольку структурной единицей ЛПС, активирующей иммунную систему, является липид А, в качестве объекта для исследования эффективности сорбции использовали форму ЛПС без О-антигенной цепи с промежуточной длиной коровой части, Rс-форму. Для определения наличия эндотоксинов с помощью ЛАЛ-теста использовался набор реактивов Pyrosate®. В основе ЛАЛ-теста лежит способность лизата амебоцитов (форменных элементов гемолимфы) мечехвоста специфически реагировать с эндотоксинами грам-отрицательных бактерий, что приводит к образованию агрегатов, адгезии и дегрануляции амебоцитов. В результате этого взаимодействия происходит помутнение реакционной смеси, образование плотного геля, что является индикатором присутствия эндотоксина.

Установлено, что после инкубации при 37°C в течение часа 200 мг диасорб-250-амин с привитым ZnPcChol7 (5 мкМ/г) с 2 мл водного раствора эндотоксина, при исходной концентрации эндотоксина 2,5-25 ЕдЭ/мл,

результат ЛАЛ-теста с заявленной производителем чувствительностью 0,25 ед эндотоксина/мл (ЕдЭ/мл), – отрицательный, то есть концентрация эндотоксина после инкубации с сорбентом менее 0,25 ЕдЭ/мл. При введении в растворы эндотоксина 140 мМ NaCl и 4 мМ CaCl₂, концентраций, изотоничных плазме крови, результат ЛАЛ-теста также отрицательный. Таким образом, приведенные примеры показывают эффективную сорбцию эндотоксинов из водных растворов, в том числе, содержащих неорганические соли. В дальнейшем этот сорбент планируется испытать с целью создания колонок для специфической гемосорбции эндотоксинов, играющих ключевую роль в развитии сепсиса и септического шока. Содержание эндотоксина в крови пациентов с сепсисом может превышать базовый уровень в тысячи раз. Несмотря на значительные успехи, достигнутые в лечении инфекционных заболеваний, сепсис остается одной из актуальных проблем современной медицины.

4. Компьютерные модели наружной мембраны грам-отрицательной бактерии и молекул фталоцианина

ЛПС обладают крайне вариабельной химической структурой и состоят из трех основных частей: липид А, центральный олигосахарид и О-антиген. О-антиген – самая вариабельная, дистальная часть молекулы ЛПС, покрывающая поверхность грам-отрицательных бактерий и формирующая защитный барьер, препятствующий проникновению антимикробных агентов к гидрофобному бислою. О-антиген состоит из повторяющихся углеводных фрагментов, число которых может варьировать даже в пределах одного штамма бактерий и содержать от единиц до нескольких сотен таких фрагментов. Таким образом, О-антиген представляет собой гибкую, малоразветвленную полисахаридную цепочку с огромным числом степеней свободы. Из-за высокого разнообразия и большой молекулярной массы не существует достоверных экспериментальных данных, точно описывающих пространственную укладку О-антигенов на поверхности бактериальной клетки. Для описания пространственной структуры О-антигена была использована система из пар двугранных углов О-гликозидной связи (φ , ψ), (рис. 4).

В нашей работе мы проводим детальный анализ конформационной подвижности

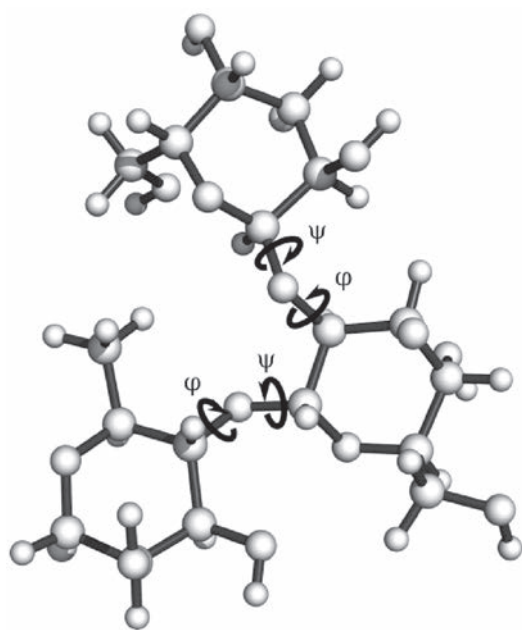


Рис. 4. Двугранные углы вокруг *O*-гликозидных связей, определяющие пространственную структуру *O*-антигенной цепи молекулы ЛПС (ϕ , ψ).

O-антигена с помощью методов молекулярно-динамического (МД) моделирования. Нами была разработана МД модель одиночной молекулы ЛПС на базе силового поля OPLS-AA [4], а также модель фрагмента клеточной мембраны грам-отрицательной бактерии, состоящая из 20 полных молекул ЛПС во внешнем монослое, 20 молекул ЛПС без *O*-антигена во внутреннем монослое и 8 интегральных белков. Построенные модели были использованы для продолжительных МД расчетов с использованием пакета программ GROMACS [5], по результатам которых был проведен анализ конформационной подвижности *O*-антигенной части молекул ЛПС.

Было показано, что существуют два минимума потенциальной энергии, отвечающие конформациям с двумя положительными или двумя отрицательными углами (ϕ , ψ). Поскольку пара двугранных углов одного знака задает направление закручивания цепочки

атомов в спираль, то конформация молекулы может представлять собой как правую, так и левую спираль (рис. 5). Существование как правых так и левых спиральных мотивов в структуре *O*-антигенной цепи сильно отличает структуру этого полисахарида от других биополимеров, таких как нуклеиновые кислоты и белки. Чередование право- и левозакрученных фрагментов приводит к более сложной и крайне нерегулярной пространственной структуре молекулы ЛПС.

Наружная мембрана грам-отрицательной бактерии представляет собой асимметричный бислой, имеющий сложную многокомпонентную структуру и защищающий бактерию от различных внешних воздействий. В нашей работе мы рассмотрели модель, представляющую собой ЛПС-ЛПС бислой, содержащий интегральные белки. Внутренний монослой содержал ЛПС без *O*-антигена, а внешний монослой – полноценные ЛПС молекулы. В процессе МД расчетов модельной мембраны мы проследили процесс термического разрушения изначальной спиральной структуры *O*-антигена. Было показано, что полная реорганизация *O*-антигенов в мембране происходит за счет изменения всего нескольких степеней свободы. Так, меняется конформация одного из углеводных остатков (маннозы), а также происходит поворот вокруг всего одной *O*-гликозидной связи.

Этих изменений оказывается достаточно для полного разрушения стартовой структуры и образования ранее не наблюдавшегося ни в расчётах [6], ни экспериментально состояния. В финальной структуре цепочки *O*-антигенов сильно запутаны друг относительно друга и формируют водные полости над интегральными белками (рис. 6). Таким образом, *O*-антиген, содержащий примембранный слой, оказывается крайне неоднородным, напоминающим лабиринт. Этот гетерогенный слой дол-

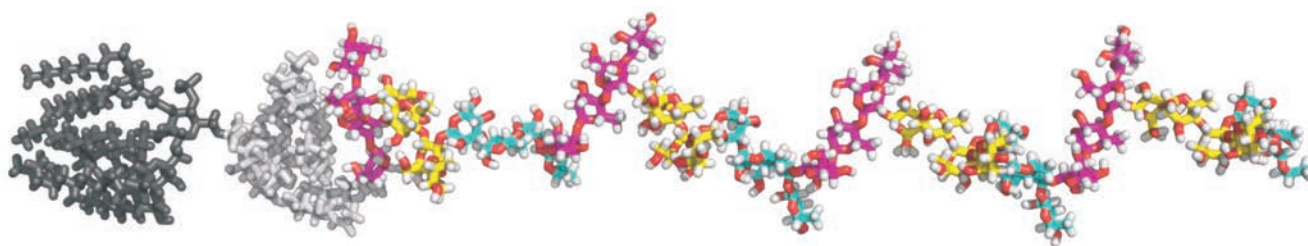


Рис. 5. Пространственная структура молекулы ЛПС. Спиралевидная конформация *O*-антигена обеспечена выбором двугранных углов при *O*-гликозидной связи.

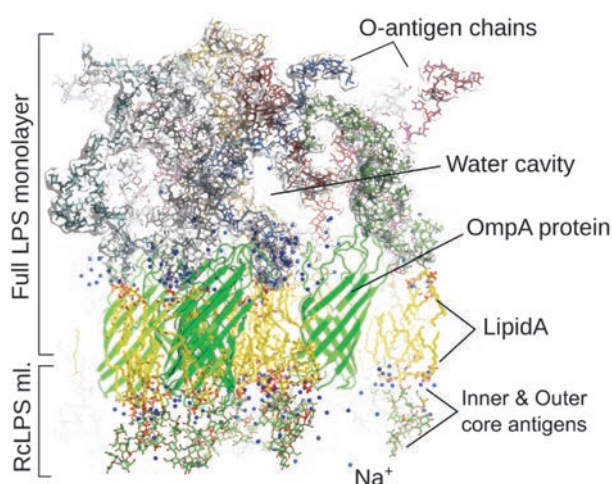


Рис. 6. Модель мембраны грамотрицательной бактерии после 500 нс МД симуляции.

жен существенно замедлять диффузию в околосмембранном пространстве и может иметь адаптивное значение для бактерии.

С целью проведения в последующем компьютерного моделирования связывания молекул ЛПС и Фц нами была построена компьютерная модель молекулы ZnPc8+. В силу особенностей синтеза образец ZnPc8+ представляет собой смесь изомеров с различным положением заместителей в макроциклическом ядре. Поэтому для построения модели нами были оценены наиболее вероятные позиции остатков холина в молекуле, для чего мы рассчитали вероятности последовательного электрофильного присоединения заряженных остатков к макроциклическому ядру при

помощи функций Фукуи.

На основе функций Фукуи, а также на основе стерических факторов, нами были предложены три варианта молекулы, которые могут быть представлены в смеси изомеров. Для каждой из этих молекул была построена топология, включающая оптимизацию геометрии молекулы в базисе *cc-pVDZ* в рамках теории функционала плотности с трехпараметрическим потенциалом *B3LYP5* и расчет парциальных зарядов. Квантово-механические расчеты были выполнены с помощью программного пакета *Firefly*, расчет точечных зарядов на атомах был произведен на основе алгоритма *RESP*. Вычисления как одиночных молекул ЛПС в воде, и тем более агрегатов и частей мембран, и связывание с ними молекул фталоцианинов являются весьма ресурсоемкими и требуют высокопроизводительную вычислительную архитектуру для их проведения. Вычисления проводятся с использованием суперкомпьютеров «Ломоносов» и «Чебышев» суперкомпьютерного центра МГУ имени М.В. Ломоносова. Результаты исследования предположительно позволят осуществить выбор оптимальных структур фотосенсибилизаторов и сорбентов эндотоксинов.

На основе нового сорбента, разработанного в данном исследовании, возможно будет создание оригинальной колонки для специфической сорбции эндотоксинов из инъекционных препаратов, плазмы и цельной крови.

Литература

1. Страховская М.Г., Беленикина Н.С., Никитина В.В., Коваленко С.Ю., Коваленко И.Б., Аверьянов А.В., Рубин А.Б. Перспективный фотосенсибилизатор для антимикробной фотодинамической терапии. *Клиническая практика* 2013; 1:25-30.
2. Страховская М., Кузьмин С., Плакунов В. Эффективность октакис(холинил)фталоцианина цинка в фотодинамической инактивации бактериальных биопленок. *Фотодинамическая терапия и фотодиагностика*. 2014. № 1. С. 17.
3. Strakhovskaya M.G., Nikitina V., Belenikina N.S., Ivanova E., Rubin A.B. Interaction of polycationic phthalocyanine photosensitizers with bioluminescent bacterial cells investigated by zeta potential measurements / Book of Abstracts 15th Congress of the European Society for Photobiology, Liège (Belgium), 2013, P.91.
4. W. L. Jorgensen et al. Development and testing of the OPLS all-atom force field on conformational energetics and properties of organic liquids // *Journal of the American Chemical Society*, 1996, v. 118, pp. 11225–36.
5. B. Hess et al. GROMACS 4: Algorithms for Highly Efficient, Load-Balanced, and Scalable Molecular Simulation // *Journal of Chemical Theory and Computation*, 2008, v. 4, pp. 435–47.
6. E. L. Wu et al. Molecular Dynamics and NMR Spectroscopy Studies of E. coli Lipopolysaccharide Structure and Dynamics. *Biophysical Journal*, 2013; 105: 1444–55.

Информация об авторах:

*Коваленко Илья Борисович, кандидат физико-математических наук, заведующий лабораторией молекулярного моделирования и биоинформатики, ФНКЦ ФМБА России.
E-mail: ikovakenko78@gmail.com*

*Страховская Марина Глебовна, доктор биологических наук, ФНКЦ ФМБА России, кафедра биофизики биологического факультета МГУ имени М.В.Ломоносова, старший научный сотрудник,
E-mail: maristra@yandex.ru*

*Коваленко Светлана Юрьевна, научный сотрудник. ФНКЦ ФМБА России.
E-mail: zaylanka@gmail.com*

*Галочкина Татьяна Владимировна, ФНКЦ ФМБА России, лаборант, кафедра биофизики биологического факультета МГУ имени М.В.Ломоносова, аспирант.
E-mail: tat.galochkina@gmail.com*

*Зленко Дмитрий Владимирович, кандидат биологических наук, кафедра биофизики биологического факультета МГУ имени М.В.Ломоносова, старший научный сотрудник.
E-mail: dvzlenko@gmail.com*

*Нестеренко Алексей Михайлович, кандидат биологических наук, НИИ Физико-химической биологии МГУ имени М.В.Ломоносова, научный сотрудник.
E-mail: comconadin@gmail.com*

*Аверьянов Александр Вячеславович, доктор медицинских наук, зав. отделением пульмонологии ФНКЦ ФМБА России.
E-mail: averyanovav@mail.ru*