

## КОМПЬЮТЕРНОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ БАКТЕРИАЛЬНОГО ЭНДОТОКСИНА С ПОЛИКАТИОНОМ-ХИТОЗАНОМ

Заводинский Виктор Григорьевич,<sup>1\*</sup> Гниденко Александр Анатольевич,<sup>1</sup>  
Давыдова Виктория Николаевна<sup>2</sup> и Ермак Ирина Михайловна<sup>2+</sup>

<sup>1</sup> Институт материаловедения ХНЦ ДВО РАН. Ул. Тихоокеанская, 153. Хабаровск 680042. Россия.

<sup>2</sup> Тихоокеанский институт биоорганической химии ДВО РАН. Пр-т 100-летия Владивостоку, 159.  
г. Владивосток 690022. Россия. Тел./факс: (4232) 314-050. E-mail: iren@piboc.dvo.ru

\*Ведущий направление; <sup>+</sup>Поддерживающий переписку

**Ключевые слова:** липополисахариды, эндотоксин, хитозан, образование комплекса, квантово-химическое моделирование, метод AM1.

### Резюме

Взаимодействие бактериального эндотоксина (липополисахарида - ЛПС) с природным поликатионом - хитозаном (ХТ) исследовано с помощью компьютерного моделирования. Для теоретического исследования был использован квантово-химический полуэмпирический метод AM1, а экспериментального - спектрофотометрический метод. Были изучены несколько конфигураций возможного связывания ЛПС и ХТ.

### Введение

Эндотоксины – основные компоненты наружной мембраны грам-отрицательных бактерий, представляют собой липополисахариды (ЛПС) - высокомолекулярные амфифильные соединения, сочетающие в пределах одной макромолекулы гидрофильный (углеводный) и гидрофобный (липидный) фрагменты. Молекула ЛПС несет на своей поверхности отрицательный заряд за счет фосфатных, пиррофосфатных и карбоксильных групп, которые локализуются главным образом в липиде А и внутренней части кора [1]. Многие биологические свойства ЛПС, связаны со способностью взаимодействовать с различными соединениями, в основном, катионной природы [2]. Молекулярные механизмы, лежащие в основе таких взаимодействий, изучены недостаточно. Это обусловлено природой самих ЛПС, а именно межмолекулярным, в основном гидрофобным взаимодействием между макромолекулами ЛПС, приводящим к образованию крупных агрегатов в растворе [3]. В то же время связывание ЛПС с поликатионами протекает с участием гидрофобной липидной компоненты [4,5].

Природный поликатион хитозан (ХТ) представляет собой полисахарид, состоящий из остатков глюкозамина, связанных гликозидной связью.

Ранее нами было показано, что хитозан образует устойчивые комплексы с ЛПС, и модифицирует биологические свойства последнего [6]. Такое комплексообразование представляет собой многостадийный процесс, который зависит от различных факторов [7]. Цель данной работы – изучить взаимодействие ЛПС и ХТ методом компьютерного моделирования, чтобы получить количественную информацию о молекулярных механизмах этого процесса.

### Результаты и дискуссия

#### Компьютерное моделирование

Для моделирования взаимодействия ЛПС и ХТ мы использовали хорошо известный квантово-химический метод AM1 [12], реализованный в виде пакета CLUSTER-Z1 [13]. Данный пакет позволяет оптимизировать молекулярные конфигурации и находить их полные энергии.

Благодаря квантово-химическому подходу и хорошему выбору параметров, достоверность метода AM1 близка к достоверности лучших расчетных методов, исходящих из первых принципов. В то же время, по сравнению с неэмпирическими методами, метод AM1 позволяет исследовать значительно более крупные молекулярные объекты. В частности, возможно проведение расчетов для объектов, содержащих несколько сот атомов. Однако, макромолекулы ЛПС и ХТ содержат значительно большие количества атомов (десятки тысяч). Поэтому, для изучения их взаимодействия были использованы фрагменты молекул (кластеры), показанные на рис. 1. Все оборванные связи кластеров насыщены атомами водорода. Численная точность определения энергий составляла около 0.1 эВ и определялась трудностями нахождения энергетических минимумов для неупорядоченных систем. Численная ошибка определения атомных координат составляла 0.01 нм.

Кластер, моделирующий ЛПС, состоял из четырех гидрофобных "хвостов" и трех гидрофильных активных центров (помеченных на рис. 1 как A1, A2 и A3), содержащих атомы кислорода, связанные двойными связями с фосфором и углеродом.

Мономерное звено хитозана, показанное на рис. 1, так же содержит активный центр, а именно атом азота, помеченный как B1. Для изучения влияния воды мы вносили в систему молекулы H<sub>2</sub>O, количество которых варьировалось от 10 до 60. Для оценки ошибки, связанной с использованием только одного мономерного звена хитозана, мы провели специальные тестовые вычисления с двумя и тремя звеньями.

Вначале мы изучили взаимодействие ЛПС и ХТ без воды. Было обнаружено, что центры A1 и A2 слабо активны. Когда кластеры ЛПС и ХТ помещались близко (расстояние между атомом N хитозана и атомами N, C центров A1, A2 и A3 было около 0.15 нм) они отталкивались, и между ними устанавливалось равновесное расстояние около 0.4 нм с энергией связи 0.2 эВ. Приближение же кластера поликатиона к центру A3 приводит к связыванию ХТ и ЛПС с равновесным расстоянием между

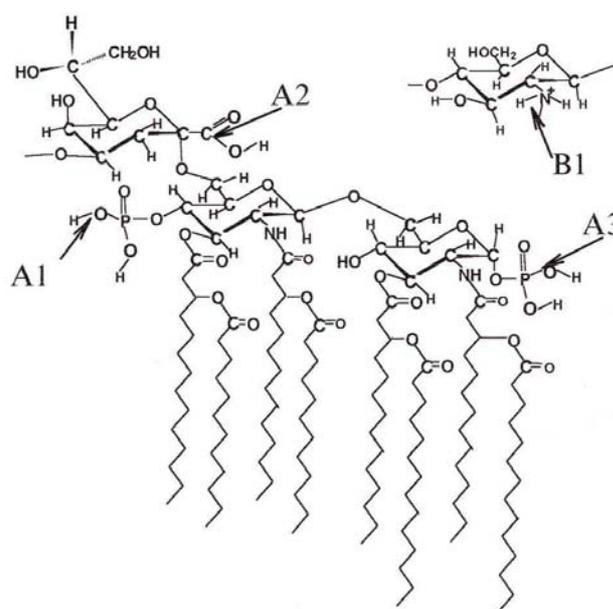


Рис. 1. Схема атомной структуры изученных фрагментов хитозана и липополисахарида.

атомами P и N 0.17 нм и энергией связи 0.5 эВ. Для больших расстояний равновесие отсутствует. Например, при помещении ХТ и ЛПС на расстояние 0.4 нм друг от друга они самопроизвольно сближаются до 0.17 нм.

Таким образом, в отсутствие воды (в вакууме) энергетически возможны два состояния: квазиравновесие (В1 центр хитозана находится на расстоянии 0.4 нм от центров А1 или А2 ЛПС) и равновесие (В1 центр хитозана находится на расстоянии 0.17 нм от центра А3 ЛПС). Энергетическая разница между этими состояниями равна 0.3 эВ.

Влияние воды было изучено для центра А3 как наиболее активного. На первом этапе было найдено равновесное расстояние 0.17 нм, т.е. такое же, как и в отсутствие воды. Затем кластер хитозана отодвигался от кластера ЛПС с шагом 0.025 нм, и на каждом шаге позиции атомов фосфора и азота фиксировались. Таким образом, фиксировалось расстояние между ними, а позиции всех остальных атомов определялись путем оптимизации геометрии системы. На каждом шаге вычислялась полная энергия. Было найдено, что присутствие воды ведет к немонотонной зависимости полной энергии от расстояния между молекулами ХТ и ЛПС. Эта зависимость выглядит как энергетический барьер (см. рис. 2), расположенный между двумя минимумами. Первый минимум соответствует равновесному расстоянию 0.17 нм, а второй был найден при расстоянии около 0.35 нм независимо от количества молекул воды  $N_w$ . Величина барьера  $\Delta E$  и энергетическая разница между ближним и дальним минимумами  $\Delta H$  зависят от количества воды, уменьшаясь при возрастании  $N_w$  и стремясь к неким константам  $\Delta E_0$  и  $\Delta H_0$ , величины которых примерно равны  $\Delta E_0 = 0.5$  эВ и  $\Delta H_0 = 0.4$  эВ.

Природа энергетического барьера связана с тем фактом, что молекулы воды, находясь между макромолекулами ХТ и ЛПС, препятствуют их свободному сближению. С другой стороны, увеличение числа молекул воды ведет к увеличению диэлектрического экранирования всех взаимодействий, и как результат, к уменьшению барьера  $\Delta E$  и энтальпии реакции  $\Delta H$ . Предельное значение  $\Delta H_0 = 0.4$  эВ согласуется с экспериментальной величиной 0.3 эВ, полученной в экспериментальной части данной работы.

Следует заметить, что макромолекулы в воде всегда частично ионизованы. Поэтому следовало бы учитывать электростатическое притяжение между ними. В наших расчетах такое притяжение не учитывалось, поскольку наш подход не позволял фиксировать заряды на атомах. Однако, нам представляется, что электростатическое притяжение не может существенно изменить энергию взаимодействия ЛПС и ХТ. Действительно, если расстояние между двумя точечными зарядами изменяется от 0.35 нм до 0.17 нм, то энергия притяжения между ними изменяется на величину  $\Delta H$ :

$$\Delta H = \frac{e^2}{a_0 \epsilon} \left( \frac{1}{0.17} - \frac{1}{0.35} \right) = 0.05 \text{ eV}$$

где  $e$  – заряд электрона,  $a_0 = 0.0529$  нм,  $\epsilon (=81)$  – диэлектрическая постоянная воды.

Таким образом, влияние электростатического взаимодействия меньше, чем ошибка нашего компьютерного моделирования и им можно пренебречь.

Наши тестовые вычисления показали, что увеличение кластера хитозана от одного мономерного звена до двух и трех звеньев изменяет энергетические характеристики взаимодействия ЛПС и ХТ на величину, не большую, чем ошибка нашего численного моделирования.

## Экспериментальная часть

Для экспериментального изучения взаимодействия ЛПС с хитозаном был использован спектрофотометрический метод. Известно, что хитозан образует комплексы с красителями, имеющие спектры поглощения, отличные от спектров поглощения чистого красителя [8]. Нами был использован анионный краситель тропеолин 000-1 - натриевая соль 4-(2-гидрокси-1-нафтилазо)бензолсульфокислоты. Краситель тропеолин 000-1 в водном растворе в видимой области спектра имеет интенсивную полосу с максимумом поглощения при 483 нм. Как было показано ранее [9], при связывании красителя с хитозаном происходит уменьшение полосы поглощения при 483 нм. При добавлении раствора ЛПС к комплексу "краситель-хитозан", последний разрушается и наблюдается увеличение оптической плотности реакционной смеси до значения экстинкции, равного поглощению свободного красителя. Это свидетельствует о вытеснении красителя из его комплекса с хитозаном и связывании эндотоксина с поликатионом.

Титрование комплекса "хитозан - тропеолин ЛПС" проводили в кюветках длиной 1 см по методу, описанному ранее [9]. К 0.6 мл раствора хитозана (100 мкг/мл) добавляли 0.94 мл раствора тропеолина (0.08 мг/мл). Полученный комплекс выдерживали в течение 20 мин. и титровали раствором ЛПС (0.5 мг/мл), добавляя порции по 40 мкл. Величину поглощения определяли на спектрофотометре *Specol* (Германия) при длине волны, равной 483 нм. Для определения параметров связывания ЛПС-ХТ были использованы методы графического представления данных: координаты Скоттча и Хилла [10,11] при разных температурах 25°, 30° и 37° С. Приведенный выше метод позволил нам на основании зависимости констант связывания от обратной температуры и закона Вант-Гоффа определить энтальпию реакции взаимодействия ЛПС и ХТ. Она была равна 0.3 эВ.

## Благодарности

Эта работа была поддержана американским фондом US CRDF Found (грант No.REC-003), Министерством образования России и грантом ДВО РАН № 03-1-0-05-004.

## Литература

- [1] M. Vaara, H. Nikaido. 1984 in Handbook of endotoxin. Vol.1. Chemistry of Endotoxin (Rietschel, E. Th., ed.) Elsevier, Amsterdam. P.1-45.
- [2] S.P. Tobias, S. Soldau, J.A. Geger, D. Mints, R.J. Ulevitch. *J.Biol.Chem.* 1995. 270. P. 10482-10488.
- [3] Ермак И.М., Ядыкина Г.Н., Соловьева Т.Ф., Оводов Ю.С. *Биофизика.* 1988. Т.23. С.288-291
- [4] N. Tanida, N. Ohno, Y. Adachi, M. Matsuura, M. Nakano, M. Kiso, A. Hasegawa, T. Yadomae. 1993. *Biol.Pharm.Bull.* V.16. No.3. P.288-292.
- [5] K. Brandenburg, M.H.J. Koch, U. Seydel. 1998. *Eur.J.Biochem.* V.258. P.686-695.
- [6] Давыдова В.Н., Ермак И.М., Горбач В.И., Красикова И.Н., Соловьева Т.Ф. 2000. *Биохимия.* Т.65. №9. С.1082-1090.
- [7] V.N. Davidova, I.M. Yermak, V.I. Gorbach, T.F. Solov'eva. *Membr.Cell Biol.* 1999. 13. P.49-58.
- [8] Глазунов В.П., Горбач В.И. *Биоорг. химия.* 1998. Т.25/3. С.80-96.
- [9] Давыдова В.Н., Ермак И.М., Горбач В.И., Соловьева Т.Ф. 2000. *Биофизика.* Т.45. №4. С.624-630.
- [10] E. Mariell. *Биофизическая химия.* 1981. V.1. М.: Мир. P.80-96.
- [11] R.A. Stinson, J.J. Holbrook. *Biochem. J.* 1973. 131. No.3. P.719-725.
- [12] M.J.S. Dewar, E.G. Zoebisch, E.F. Healy, J.J.P. Stewart. *J.Am.Chem.Soc.* 1988. 107. P.3982.
- [13] V.D. Khavryutchenko, A.V. Khavryutchenko. DYQUAMOD: Dynamic Quantum Modeling Software for Personal Computers, Joint Inst. Nucl. Researches., Dubna and Inst. Surf. Chemistry, Nat. Acad. Sci. Ukraine. Kiev. 1993.

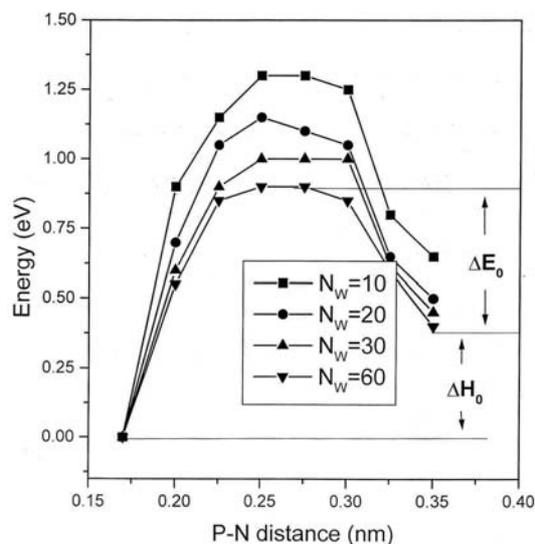


Рис. 2. Энергетический барьер для реакции связывания хитозана и липополисахарида.