

Эндотоксины. Способы удаления эндотоксинов из биологических образцов.

Введение

В широком смысле под эндотоксинами понимают бактериальные токсические вещества, которые являются структурными компонентами бактерий. Частным и наиболее упоминаемым эндотоксином являются липополисахариды (ЛПС). Липополисахариды - структурные компоненты мембран грам-негативных бактерий, поддерживающие стабильность мембраны. На одну клетку *Escherichia coli* приходится около двух миллионов молекул ЛПС. Несмотря на то, что эндотоксины достаточно прочно связаны с мембраной клеток, в процессе деления и смерти бактериальных клеток происходит высвобождение эндотоксинов. Присутствие эндотоксинов в препаратах, в особенности применяемых для внутривенного введения, представляет собой огромную проблему. Хотя сами по себе эндотоксины не являются токсическими веществами, их попадание в организм активирует иммунную систему - в основном процесс идет через активацию моноцитов и макрофагов - что приводит к высвобождению целого ряда противовоспалительных медиаторов, таких как фактор некроза опухоли (tumor necrosis factor - TNF), интерлейкины (особенно IL-6 и IL-1) и других агентов. Развитие каскадной противовоспалительной реакции, сопровождающейся повышением температуры и лихорадкой (так называемый, эндотоксический шок), может привести к летальному исходу. По сравнению с белками, эндотоксины очень стабильны. Их стабильность сохраняется при высоких значениях температур и в широком диапазоне pH.

История эндотоксинов

Работы, описывающие токсический эффект после внутривенного введения растворов, приготовленных из бактериальных культур и не содержащих микроорганизмов, начали публиковать с конца 19-ого века. И количество подобных работ постоянно увеличивалось.

В 1912 году Норт и Penfold стали использовать термин "пирогенный" (pyrogenic) для обозначения растворов, вызывающих лихорадочное состояние. В 1945 году Westphal опубликовал работу, в которой он описывал полисахаридный комплекс, обнаруженный во внешнем слое бактериальной стенки и обладающий пирогенным эффектом. В последующие годы Westphal опубликовал еще несколько работ, где он продолжал изучать липосахариды из различных энтеробактерий.

В последующие годы молекулярная организация эндотоксинов и механизм их воздействия на организм продолжали изучаться.

Химические и физические свойства эндотоксина

Эндотоксины, также называемые полисахаридами (ЛПС), являются главным компонентом внешней мембраны грам-негативных бактерий (см. рис. 1).

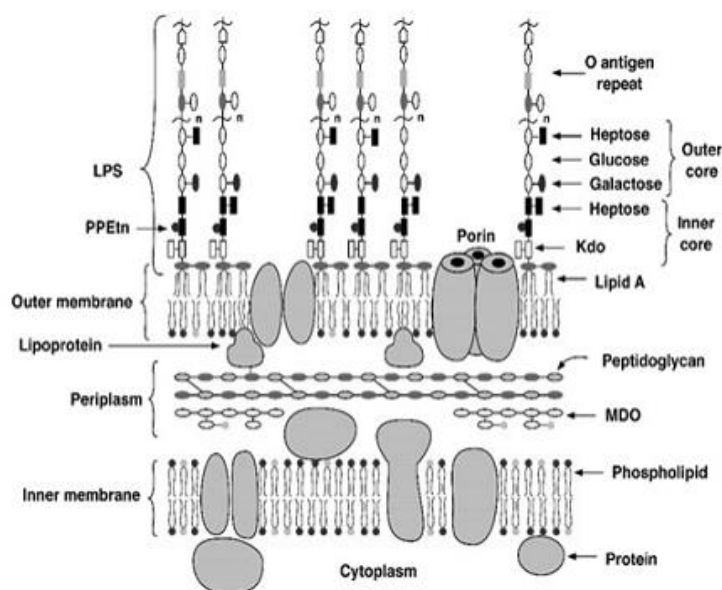
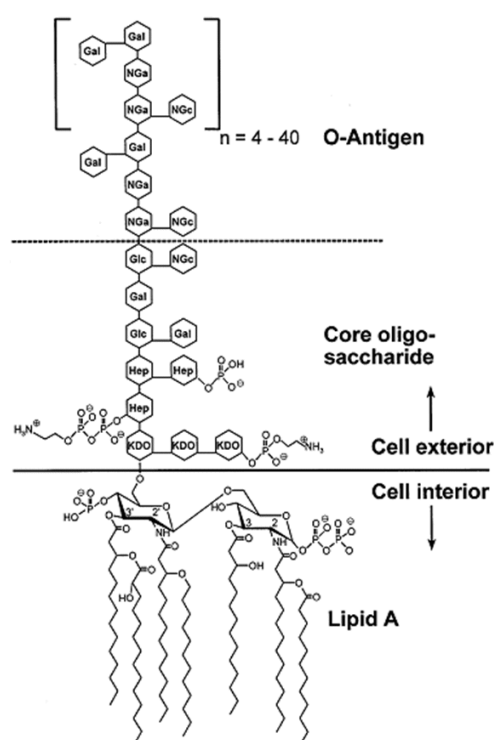


Рисунок 1: Молекулярная модель внутренней и внешней мембран из *E. coli* K-12 по Raetz et al., 1991 (Raetz CR, Ulevitch RJ, Wright SD, Sibley CH, Ding A, Nathan CF. Gram-negative endotoxin: an extraordinary lipid with profound effects on eukaryotic signal transduction. The FASEB Journal 5(12):2652-2660. 1991). Геометрические формы: овалы и прямоугольники представляют сахарные остатки, кружки - полярные рабочие группы различных липидов. Сокращения: PPEtn (ethanolamine pyrophosphate); LPS (lipopolysaccharide); Kdo (2-keto-3-deoxyoctonic acid).

Эндотоксины состоят из гидрофильного полисахаридного остатка, который соединен ковалентной связью с гидрофобным липидным остатком (липид А) (см. рис. 2).



Липосахариды большинства видов бактерий состоят из трех основных блоков:

- блок **О-антигена** (O-antigen region),
- **олигосахарид сердцевинны** (core oligosaccharide),
- **липид А** (lipid A).

О-антиген в основном состоит из последовательности одинаковых олигосахаридов (от трех до восьми моносахаридов каждый), определяющих видовую специфичность и серологическую особенность соответствующей бактерии.

Олигосахарид сердцевинны имеет консервативную структуру с внутренней областью 3-дезоксид-D-манно-2-октулозоновой кислоты (KDO) - гептоза и внешней области состоящей из гексоз. Так, например, среди видов *E.coli* известно пять разных типов сердцевинной области.

Липид А является самой консервативной частью эндотоксина и отвечает за большинство биологических свойств эндотоксина, в том числе, за его биологическую токсичность. Бактериальные штаммы, в составе мембраны которых отсутствовал бы липид А или эндотоксин, не известны современной науке.

Рисунок 2: Химическая структура эндотоксина из *E. coli* O111:B4 по Ohno and Morrison 1989 (Ohno N, Morrison DC. Lipopolysaccharide interaction with lysozyme: binding of lipopolysaccharide to lysozyme and inhibition of lysozyme enzymatic activity. J Biol Chem 264:4434–4441. 1989). (Hep) L-glycerol-D-manno-heptose; (Gal) galactose; (Glc) glucose; (KDO) 2-keto-3-deoxyoctonic acid; (NGa) N-acetyl-galactosamine; (NGc) N-acetyl-glucosamine.

Молекулярная масса мономера эндотоксина обычно составляет от 10 до 70 кДа. Но встречаются и отдельные исключения: 2.5 кДа с коротким О-антигеном до 70 кДа с очень длинным О-антигеном.

Клетки "теряют" эндотоксины в большом количестве во время своей гибели, а также в процессе роста и деления. Эндотоксины устойчивы к высоким температурам и не разрушаются при стандартных режимах автоклавирования. Эндотоксины можно разрушить только при использовании следующих режимов: 250 °С в течение 30 минут или 180 °С в течение более 3 часов. Применение кислот и щелочей с концентрацией не менее 0.1 М также может привести к разрушению эндотоксинов.

Методы удаления эндотоксинов

Существует целый ряд методов, которые применяют для удаления эндотоксинов: ионообменная хроматография, аффинные сорбенты, гель-фильтрация, ультрафильтрация, центрифугирование в градиенте сахарозы, использование системы двухфазного разделения.

Способ удаления определяется масштабами и экономической целесообразностью. Для удаления эндотоксинов из больших объемов обычно используют ультрафильтрацию и ионообменную хроматографию. Ультрафильтрация очень эффективна для удаления эндотоксинов из воды и водных растворов, но совершенно не годится в случаях очистки от эндотоксинов растворов, содержащих белки или нуклеиновые кислоты. Те же недостатки ультрафильтрации относятся и к ионообменной хроматографии.

Использование аффинных сорбентов, как правило, иммобилизованных на агарозе, сефарозе, акриламиде и других носителях, является, пожалуй, самым эффективным способом удаления эндотоксинов. Основные минусы такого подхода: **1.** длительность процесса удаления (необходимо многократно пропускать пробу через колонку, скорость потока при этом не может быть большой, т.к. это приводит к деформации сорбента), **2.** разбавление пробы в процессе очистки может быть от 10 до 100-кратной, **3.** стоимость аффинного сорбента может быть очень большой.

Двухфазная система разделения является самым дешевым и самым эффективным способом удаления эндотоксинов. Основной принцип этого метода - образование двухфазной мицеллярной системы за счет добавляемого в водный раствор мицеллообразующего полимера. Эндотоксин захватывается образующимися мицеллами из водной гидрофильной части и при разделении фаз остается в гидрофобной среде (см. рис. 3).

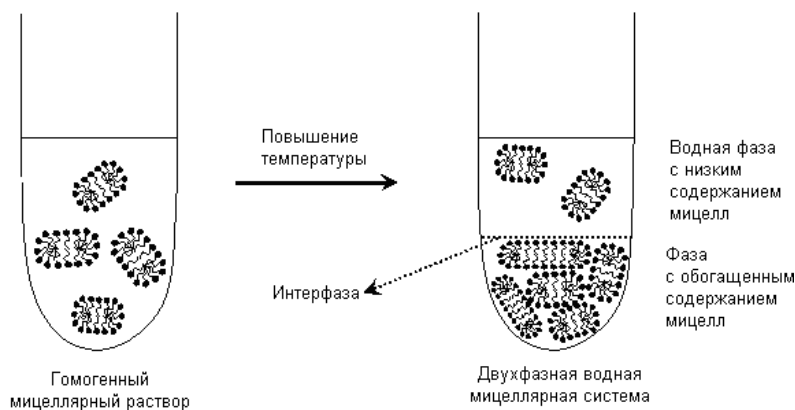


Рисунок 3: Схема двухфазного мицеллярного разделения, вызванного повышением температуры. Мицеллы могут присутствовать и в водной фазе, но их размер значительно меньше, чем в нижней гидрофобной части.

Использование трех циклов обработки двухфазной системой позволяет снизить уровень эндотоксинов во всех рекомбинантных белках, получаемых из *E. coli*, более чем на 99%. При этом биологическая активность и свойства самих белков не претерпевают изменений.

Минус двухфазной системы - в водной фазе после разделения всегда остается некоторое количество добавляемого мицеллообразующего полимера. Некоторые исследователи считают, что примеси этого полимера оказывают негативное влияние при дальнейшем использовании очищенных таким образом препаратов. Другие исследователи опровергают негативное такое негативное влияние. Наш опыт использования препаратов, очищенных от эндотоксинов при помощи двухфазной мицеллярной системы, как в системе *in vitro*, так и *in vivo*, не показал никаких негативных эффектов ни на клетки, ни на животных, в которые вводили очищенные препараты.

По-видимому, работа с такой системой требует некоторых навыков и их недостаток может проявляться в последующих результатах.

Определение эндотоксинов

Для определения эндотоксинов стандартно применяют LAL тест (LAL: *Limulus Amebocyte Lysate*). С семидесятых годов этот тест вытеснил применявшийся ранее так называемый "пирогенный тест", когда испытуемый препарат вводили кроликам. Кролики очень чувствительны к эндотоксинам и их реакция на вводимые препараты долгое время служила индикатором пирогенности.

В настоящее время стал применяться также EAA тест (EAA: *Endotoxin Activity Assay*). Этот тест разработан компанией Spectral Diagnostics Inc. (www.spectraldx.com) и позволяет выявлять уровень эндотоксинов в крови.

По международной классификации концентрацию эндотоксинов обозначают в EU (endotoxin units): EU/мл или EU/мг. Одна единица (1 EU) приблизительно соответствует 100 пг эндотоксина.

Одна бактериальная грам-негативная клетка содержит приблизительно 10^{-15} г или 1 фг эндотоксина, таким образом, 1 EU производят 10^5 бактерий. 1 мл ночной культуры *E. coli* содержит от $5 \cdot 10^8$ до 10^9 клеток, что соответствует до 10'000 EU на 1 мл культуры.

Максимально допустимый уровень эндотоксина при внутривенном введении - 5 EU на кг тела в течение часа.

$$1 \text{ EU} = 100 \text{ пг эндотоксина} = 10^5 \text{ бактерий}$$

$$1 \text{ мл ночной культуры } E. coli = \text{от } 5 \cdot 10^8 \text{ до } 10^9 \text{ клеток} = \text{до } 10'000 \text{ EU}$$

В настоящее время компания *Силекс* предлагает два препарата для удаления эндотоксинов:

- ♦ полимер *Endotoxin Extractor*
- ♦ магнитные частицы с пришитым аффинным сорбентом (**MERP: Magnetic Endotoxin Removal Particles**)

Полимер *Endotoxin Extractor*

Полимер *Endotoxin Extractor* предназначен для удаления эндотоксинов из водных растворов методом двухфазного мицеллярного разделения с экстракцией эндотоксинов в гидрофобную фазу, образуемую полимером. Для улучшения визуализации при работе с двухфазной системой в полимер добавлен специально подобранный краситель. Краситель не мешает в последующих манипуляциях с освобожденным от эндотоксинов материалом.

Протокол экстракции

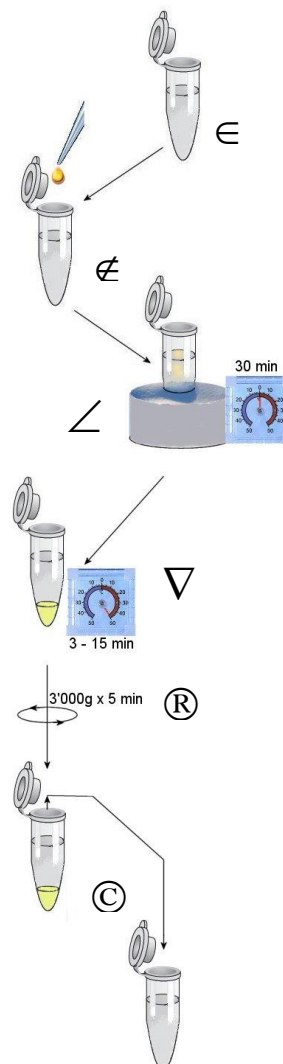
(перед использованием разморозьте полимер при комнатной температуре и тщательно перемешайте)

1. Внесите в пробирку водный раствор образца
 - объем пробирки зависит от объема обрабатываемой пробы
 - водный раствор может содержать буферирующие агенты и соли, это не влияет на результаты удаления эндотоксинов
2. Добавьте к водному раствору образца полимер *Endotoxin Extractor* в количестве 1/10 от объема образца.
 - например, на 100 мкл водного раствора нужно добавлять 10 мкл полимера
 - при добавлении полимера к водному раствору с рН выше 7.2 цвет добавленного красителя меняется на красный. Изменение цвета не влияют на свойства полимера или материала
3. Тщательно перемешайте полимер пипетированием. Инкубируйте пробирку в течение 30 мин при 0 °С.
 - в процессе инкубации полимер равномерно перераспределяется по всему объему раствора, связывая эндотоксины
4. Перенесите пробирку в термоблок (или водяную баню) с температурой +50 °С на 3 мин (для пробирок объемом 0.5 мл), на 5 мин (для пробирок объемом 1.5-2.0 мл), или на 15 мин для пробирок большего объема.
 - в процессе инкубации при +50 °С происходит разделение ранее однородного раствора на две фазы: верхняя непрозрачная водная фаза содержит материал, свободный от эндотоксинов, нижняя окрашенная фаза представляет собой полимер, связавший эндотоксины
5. Центрифугируйте пробирку при 3'000 g в течение 5 минут.
6. Перенесите прозрачную водную фазу, содержащую свободный от эндотоксинов материал, в новую пробирку.

Обычно, для удаления эндотоксинов из водных растворов препаратов плазмидной ДНК выделенных по методу Бирнбойма и Доли (*Birnboim H.C., Doly J. Nucleic Acids Res., 7, 1513 (1979)*) достаточно двух процедур обработки полимером. Но процедуру можно повторить до четырех раз. Особенно рекомендуется обработка из трех-четырёх процедур для очистки растворов рекомбинантных белков получаемых из штаммов *E. coli*, которые могут содержать значительные примеси эндотоксинов.

Препарат ДНК после очистки от эндотоксинов рекомендуем пересадить, используя изопропанол или этанол. Пересаживаемую ДНК растворите в нужном объеме воды, свободной от эндотоксинов, или соответствующего буфера.

Для препаратов белков пересадение не является необходимым. Однако, использование пересадения с помощью ацетона и растворение в соответствующем буфере также возможно.



MERP : магнитные частицы с иммобилизованным аффинным сорбентом

Магнитные частицы с иммобилизованным аффинным сорбентом (MERP) представляют собой удобный инструмент для удаления эндотоксинов из препаратов ДНК.

1 мл частиц способен удалить до 20'000 EU эндотоксина. Частицы после использования можно регенерировать и использовать повторно как минимум пять раз.

Протокол экстракции эндотоксинов

Перед использованием, в том числе и в первый раз, частицы должны быть регенерированы при помощи *Буфера для регенерации MERP*. Это необходимо для того, чтобы быть полностью уверенным, что частицы не содержат примеси эндотоксинов, которые могли попасть в суспензию частиц ранее. При работе с частицами и очищаемыми препаратами используйте только апиrogenные растворы и материалы.

Процедура регенерации частиц

1. Внесите в пробирку необходимое количество суспензии частиц из расчета 100 мкл суспензии на 1 мкг препарата ДНК.
2. Поместите пробирку в магнитный штатив, дайте частицам собраться в течение 1 мин, удалите супернатант.
3. Перенесите пробирку в обычный штатив и внесите 5-кратный объем *Буфера для регенерации MERP* (если было взято 10 мкл частиц, добавляйте 50 мкл буфера).
4. Ресуспендируйте частицы в буфере и оставьте частицы на 5 минут при комнатной температуре.
5. Поместите пробирку в магнитный штатив, дайте частицам собраться в течение 1 мин, удалите супернатант.
6. Перенесите пробирку в обычный штатив и внесите 5-кратный объем апиrogenной воды (если было взято 10 мкл частиц, добавляйте 50 мкл воды).
7. Ресуспендируйте частицы в воде, поместите пробирку в магнитный штатив, дайте частицам собраться в течение 1 мин, удалите супернатант.
8. Повторите процедуру, описанную в п. 7, еще два раза.
9. После удаления супернатанта и окончания промывки, к частицам можно сразу добавлять водный препарат ДНК.

Процедура удаления эндотоксина

1. Внесите в пробирку водный раствор образца
 - количество используемых частиц зависит от количества ДНК в обрабатываемой пробе (рекомендуем использовать 100 мкл частиц для обработки 1 мкг ДНК)
 - препарат ДНК может содержать примеси (белки, соли, детергенты), которые могут влиять на эффективность удаления эндотоксина
2. Тщательно ресуспендируйте частицы пипетированием. Инкубируйте пробирку в течение 5 минут при комнатной температуре.
 - в процессе инкубации частицы равномерно перераспределяются по всему объему раствора, связывая эндотоксин
3. Перенесите пробирку в магнитный штатив, дайте частицам собраться в течение 1 мин, перенесите супернатант, содержащий препарат ДНК, в чистую апиrogenную пробирку.
 - процесс обработки магнитными частицами рекомендуется повторить еще раз с новой аликвотой магнитных частиц
4. Собранный препарат ДНК рекомендуем пересадить изопропанолом (методику осаждения изопропанолом см. в разделе **Дополнительная информация**). Помните, что все растворы для этой процедуры должны быть апиrogenными.
5. Использованные магнитные частицы соберите и проведите процедуру регенерации, как описано выше. Помните, что все растворы и пластик для этой процедуры должны быть апиrogenными.

Выбор реагента для удаления эндотоксина: *Endotoxin Extractor* или магнитные частицы

Прежде чем сделать выбор в пользу того или иного реагента, необходимо четко себе представлять следующее:

- ♦ для работы с каким материалом будет применен выбранный реагент
- ♦ как будет использован обработанный материал в дальнейшем

В настоящее время целый ряд компаний выпускаем колонки и сорбенты, предназначенные для удаления эндотоксинов из препаратов. Все компании используют разные принципы и технологии для удаления эндотоксинов. В результате, одни продукты подходят только для работы с препаратами белков (при использовании с препаратами ДНК вместе с эндотоксинами успешно удаляется и ДНК), другие только для препаратов ДНК (при использовании с белковыми растворами подобные сорбенты "забиваются" белками и теряют способность связывать ДНК), третьи могут использоваться как для препаратов ДНК, так и для препаратов белков.

Чтобы не ошибиться в выборе, следует внимательно читать описание к предлагаемому продукту. Иначе не избежать горького разочарования.

Итак, чем существенно отличаются два описанных выше продукта нашей компании *Endotoxin Extractor* и *магнитные частицы с иммобилизованным эндотоксин-специфическим сорбентом*.

	<i>Endotoxin Extractor</i>	<i>Магнитные частицы с иммобилизованным эндотоксин-специфическим сорбентом</i>
Возможность использования	для препаратов ДНК и белков	для препаратов ДНК
Удобство использования	среднее	высокое
Стоимость препарата	низкая	высокая
Стабильность препарата	высокая	высокая
Эффективность удаления эндотоксина	очень высокая	высокая
Возможность использования препарата после обработки <i>in vivo</i>	может потребоваться дополнительная обработка	дополнительной обработки не требуется
Возможность регенерации продукта	не регенерируется	> 5 раз

Мы всегда готовы помочь Вам определиться с выбором.

04 марта 2010 года