

УДК 595.: 768.1

¹Н.Ш. Акимбеков, ²И.Э. Дигель, ¹И.С. Савицкая, ¹А.А. Жубанова, ¹К.Т. Тастамбек

¹Казахский национальный университет им. аль-Фараби, Казахстан, г. Алматы

²Аахенский университет прикладных наук, Германия, г. Юлих

*E-mail: Akimbekov.Nuraly@kaznu.kz

Изучение процессов элиминации бактериального эндотоксина ЛПС из биологических жидкостей в условиях проточной колонки с карбонизованной рисовой шелухой

Одним из перспективных направлений детоксикации эндотоксинов, основанных на физико-химических процессах, является их сорбция наноструктурированными материалами в условиях проточной колонки. В данной статье приводятся результаты исследований по изучению динамики процесса элиминации липополисахарида (ЛПС) токсического шока бактериального происхождения путем его сорбции из биологических жидкостей наноструктурированной карбонизованной рисовой шелухи. В работе в качестве модельной системы использовался биологический раствор, содержащий ЛПС.

Установлено, что в условиях проточной колонки с карбонизованной рисовой шелухой (КРШ) эффективность извлечения эндотоксина ЛПС из биологических жидкостей составляет 98%. Такие результаты позволяют констатировать, что метод извлечения ЛПС колоночным методом достаточно высока, что позволяет использовать его как метод выбора при эндотоксиновой агрессии.

Ключевые слова: эндотоксин, липополисахарид (ЛПС), элиминация, сорбент, карбонизованная рисовая шелуха.

N.Sh. Akimbekov, I.E. Digel, I.S. Savitkaya, A.A. Zhubanova, K.T. Tastambek
Investigations of LPS endotoxin elimination in the flowing column conditions with the sorbent on the basis of carbonized rice husk

This research work is devoted to study lipopolysaccharide (LPS) detoxication on the basis of its sorption by nanostructured carbonized rice husk from biological liquids.

During experimental tests it is established that in the flowing column conditions with carbonized rice husk the elimination of LPS endotoxin from biological liquids shows 98%.

Keywords: phytoextract, carbonized rice husk, sorbent, antimicrobial properties, functionalization, herbal plants, toxic infections, purulent inflammation processes.

Н.Ш. Акимбеков, И.Э. Дигель, И.С. Савицкая, А.А. Жубанова, К.Т. Тастамбек
Карбонизделген күріш қауызы негізінде сорбенті бар ағынды бағана жағдайында бактериялды ЛПС эндотоксинінің элиминациясын зерттеу

Ғылыми жұмыс карбонизделген күріш қауызы негізіндегі сорбентті пайдалана отырып ЛПС эндотоксинді детоксикациялауға бағытталған.

Тәжірибелік зерттеу жұмыстары барысында карбонизделген күріш қауызы бар ағынды бағана жағдайында биологиялық сұйықтықтардағы ЛПС эндотоксинінің элиминациясы 98%-ға жететіні белгілі болды.

Түйін сөздер: фитоэкстракт, карбонизделген күріш қауызы, сорбент, антимикробтық қасиет, функционализация, дәрілік өсімдіктер, токсикоинфекция, ірінді-қабыну процесі.

В последние годы отмечается увеличение количества больных тяжелыми заболеваниями, вызванными эндотоксинами грамотрицательных бактерий, представляющих собой термостабильные липополисахариды, являющиеся компонентом их клеточной мембраны и потому несекретируемые во внешнюю среду. Бакте-

риальные эндотоксины представляют собой биологический «обоюдоострый меч», который, с одной стороны, вызывает серию патофизиологических реакций, в ряде случаев заканчивающихся летальным исходом, с другой – стимулирует факторы неспецифической резистентности макроорганизма.

Большое внимание уделяется учеными разработке стратегии терапии токсического шока. Детоксикационная терапия этого заболевания в любом ее варианте предполагает процедуры, связанные с элиминацией токсиканта из организма больного. Основным требованием к этим процедурам является их безвредность и эффективность. Нарастающая динамика случаев токсического шока у населения, недостаточность эффективных препаратов для детоксикации эндотоксина диктуют необходимость расширения исследований, направленных на создание биопрепаратов, способных эффективно очищать кровь и другие биологические жидкости от ЛПС.

Одним из направлений элиминации эндотоксина являются сорбционные методы, направленные на удаление ЛПС из биологических жидкостей. Результаты исследований, проведенных в ряде лабораторий, свидетельствуют о том, что большие перспективы в решении проблем элиминации ЛПС связаны с использованием в качестве сорбентов наноструктурированных углеродных материалов [1-2]. В этом случае адгезивный эффект сорбента обеспечивается как физико-химическими свойствами его поверхности, так и поверхностными свойствами сорбата. Липополисахарид, который формирует поверхность грамотрицательных бактерий, как основной компонент внешнего лепестка наружной мембраны,

участвует во взаимоотношениях бактериальной клетки с внешней средой, в частности, при их адгезии к твердым поверхностям. В ходе исследований было установлено [3], что наноструктурированные углеродные материалы способны эффективно связывать бактериальный ЛПС. Именно этот феномен-взаимодействие ЛПС с поверхностными структурами сорбента может рассматриваться как возможная причина наблюдаемой специфической адсорбции грамотрицательных бактерий на углеродные материалы [4-5].

Материалы и методы

На кафедре биотехнологии КазНУ им. аль-Фараби в качестве сорбентов для получения иммобилизованных биокатализаторов используется новый наноматериал на основе рисовой шелухи, которая после высокотемпературной карбонизации (500-700°C) приобретает свойства активных сорбентов. Методами электронной микроскопии и ИК-спектроскопии установлено, что на поверхности сорбента после высокотемпературной карбонизации увеличивается количество пор и активных сайтов. Благодаря особенностям их строения, пористости, шероховатости поверхности и механической прочности КРШ может сорбировать из разбавленных растворов различные вещества [6].



а



б

Рисунок 1 – Фрагмент колонки, заполненной КРШ (а) и экспериментальная установка (б).

Для изучения элиминирования липополисахарида в условиях проточной колонки раствор эндотоксина в концентрации 1 нг/мл подавалась снизу вверх в колонку, заполненную КРШ. Масса адсорбирующего материала – 10 г, емкость колонки – 30 см³, длина колонки – 60 см (Serologische Rotilabo® Einmalspritzen). Через каждые 10 минут производили отбор проб и определяли концентрацию ЛПС на микропланшетах (Nunc Multidishes Nunclon, 152640, 48 wells, 1,1 см²/well, 128x86mm) при помощи детекционного набора QCL-1000 Chromogenic LAL Endpoint Assay (Lonza Group Ltd, Швейцария). Оптическую плотность проб на микропланшетах измеряли на фотометрическом сканере (Bio-Rad Co., США) при 405-410 нм.

В колонку после удаления воздуха подавался раствор фосфатного буфера (PBS, pH 7,4) со скоростью 1,7 мл/мин (100 мл/ч) с помощью перистальтического насоса. Через 10 мин. подавался раствор эндотоксина в концентрации 1 нг/мл.

Результаты и их обсуждение

Эксперименты с использованием хроматографической колонки, заполненной КРШ, дают возможность проводить процесс очистки с наиболее высокой эффективностью и способствуют решению проблемы практического применения карбонизованного сорбента. Кроме того, применение колонки с различными харак-

теристиками позволяет подобрать оптимальные параметры скорости потока для эффективной элиминации ЛПС из раствора. Адсорбционная колонка состоит из насоса, создающего необходимую разность давлений, системы подводных и отводящих трубок и самой колонки, заполненной КРШ.

Как показано на рисунке 2, эффективность удаления ЛПС уже через 10-20 минут составляет 97%, далее эта величина достигает 98,2-99% и остается на этом уровне в течение 240 мин.

Это явление можно объяснить тем фактом, что на поверхности карбонизованного сорбента имеются положительно заряженные группы, способные взаимодействовать с отрицательно заряженными остатками фосфорной кислоты полярной части эндотоксина ЛПС. Необходимо подчеркнуть, что агрегаты эндотоксинов формируют супермолекулярные ансамбли, в которых остатки фосфорной кислоты имеют значительный положительный (отрицательный заряд), который и играет большую роль во взаимодействиях между молекулами ЛПС и положительно заряженными группами, находящимися на различных поверхностях.

Согласно результатам проведенных экспериментов по изучению элиминации ЛПС в растворе фосфатного буфера эффективность сорбции эндотоксина очень высокая и сорбционная емкость КРШ в отношении ЛПС составляет 98%.

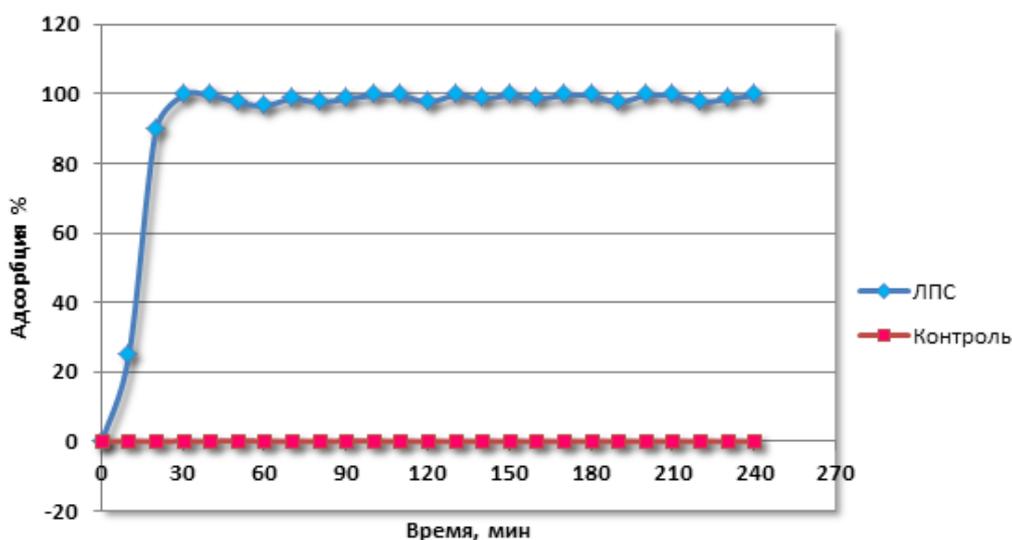


Рисунок 2 – Адсорбция ЛПС на КРШ в условиях проточной колонки

Полученные данные относительно высокой эффективности элиминации ЛПС в условиях проточной колонки, заполненной КРШ, могут служить основой для разработки технологии детоксикации липополисахарида токсического шока.

Одним из перспективных путей элиминации липополисахарида из различных сред является его сорбция на инертных носителях, имеющих большую сорбционную емкость. Представителем таких материалов является сорбент КРШ с наноструктурированной поверхностью, демонстрирующий способность к избирательной сорбции бактериального эндотоксина – ЛПС.

Заключение

Результаты экспериментов, в которых показано, что карбонизированные сорбенты, характеризующиеся наноструктурированной поверхностью, активно связывают бактериальный эндотоксин, могут служить основой для разработки методов, направленных на элиминацию ЛПС из биологических жидкостей. Внедрение таких сорбентов в медицинскую практику требует изучения процессов элиминации ЛПС в различных условиях среды (рН, температура), в присутствии естественных белков, углеводов, ПАВ и др., а также разработки условий и режимов отдельных операций и создания аппаратуры для успешного проведения детоксикационных процедур.

Литература

- 1 Petsch D., Beeskow T.C., Anspach F.B., Deckwer W.D. Membrane adsorbers for selective removal of bacterial endotoxin // *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* – 2007. – Vol. 693. - P. 79-91.
- 2 Гусаров Д.А. Способы очистки биофармацевтических белков от эндотоксинов клеточной стенки // *Биофармацевтический журнал.* – 2009. – Т. 17 – № 3. – С. 10-17.
- 3 Mansurov Z.A., Zhubanova A.A., Digel I., Artmann G. Artmann A., Savitskaja I.S., Kistaubaeva A.S., Kozhalakova A.A. The sorption of LPS toxic shock by nanoparticles on base of carbonized vegetable raw materials // *Carbon'08.* - Nagano (Japan), 2008. – P. 12-15.
- 4 Petsch D., Anspach F.B. Endotoxin removal from protein solutions // *J. Biotechnol.* – 2000. – Vol. 76, № 2-3. – P. 97-119.
- 5 Hirayama C., Sakata M., Nakamura M., Ihara H., Kunitake M., Todokoro M. Preparation of poly(epsilon-lysine) adsorbents and application to selective removal of lipopolysaccharides // *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* – 1999. - Vol. 721. - P. 187-195.
- 6 Hirayama C., Sakata M. Chromatographic removal of endotoxin from protein solutions by polymer particles // *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* – 2002. – Vol. 781, №1-2. – P. 419-432.

References

- 1 Petsch D., Beeskow T.C., Anspach F.B., Deckwer W.D. Membrane adsorbers for selective removal of bacterial endotoxin // *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* – 2007. – Vol. 693. - P. 79-91.
- 2 Gusarov D.A. The ways of purification of biopharmaceutical proteins from endotoxins // *biopharmaceutical journal.* – 2009. – Vol. 1, № 3. – С. 10-17.
- 3 Mansurov Z.A., Zhubanova A.A., Digel I., Artmann G. Artmann A., Savitskaja I.S., Kistaubaeva A.S., Kozhalakova A.A. The sorption of LPS toxic shock by nanoparticles on base of carbonized vegetable raw materials // *Carbon'08.* - Nagano (Japan), 2008. – P. 12-15.
- 4 Petsch D., Anspach F.B. Endotoxin removal from protein solutions // *J. Biotechnol.* – 2000. – Vol. 76, № 2-3. – P. 97-119.
- 5 Hirayama C., Sakata M., Nakamura M., Ihara H., Kunitake M., Todokoro M. Preparation of poly(epsilon-lysine) adsorbents and application to selective removal of lipopolysaccharides // *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* – 1999. - Vol. 721. - P. 187-195.
- 6 Hirayama C., Sakata M. Chromatographic removal of endotoxin from protein solutions by polymer particles // *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* – 2002. – Vol. 781, №1-2. – P. 419-432.