УДК:614

ИЗУЧЕНИЕ СОРБЦИОННЫХ СВОЙСТВ ПОЛИСАХАРИДОВ РАСТИТЕЛЬНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ

Красочко П.А.[1] – д.в.н., профессор; Капуцкий Ф.Н.[2] – д.х.н., профессор, академик НАН Беларуси, Красочко П.П.[3]– к.в.н., старший научный сотрудник, Зубец О.В.2– научный сотрудник, Аладьева Т.А.[1] – аспирант, [1] Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н.Вышелесского, [2] Институт физико-химических проблем Белорусского Государственного университета, [3] УО «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины»

РЕФЕРАТ

Приведены результаты изучения сорбционных свойств микрокристаллической целлюлозы в смеси с альгинатом натрия в пропорции 50:50 приготовленной по «сухому» и «мокрому» способам. Показано, что образцы целлюлозы имеют высокую сорбционную активность в отношении метиленового голубого, тяжелых металлов, вирусов инфекционного ринотрахеита и диареи.

Ключевые слова: активированная целлюлоза, сорбенты, тяжелые металлы, вирус инфекционного ринотрахеита, вирус диареи, полимеразно-цепная реакция.

ВВЕДЕНИЕ

В последние годы при конструировании вакцин начали широко применять экологически безопасные адъюванты на основе биополимеров – хитозана, целлюлозы и полисахаридов растительного происхождения. Их особенностью является безвредность для организма, высока биологическая активность и сорбционная емкость.

Особенно перспективным является возможность применения в качестве адъювантов для инактивированных вакцины модифицированной микрокристаллической целлюлозы. Микрокристаллическая целлюлоза применяется достаточно широко в фармацевтической промышленности в качестве добавки играющей роль наполнителя и загустителя таблеток, капсул, мазей, различных лекарственных средств, а также в других специальных рецептурах. В тоже время микрокристаллическая целлюлоза не содержит ионогенных групп, имеющихся в природных полисахаридах, и в силу этого не проявляет в достаточной степени, присущих им положительных качеств: повышенную гидрофильность, гелеобразование, способность химически связывать различные катионы [1,2]. Однако эти недостатки можно устранить путем подбора и модификации природных полимеров с целью повышения их сорбционных свойств. Для этого имеется возможность применения в качестве сорбента для вакцин (адъюванта) ряда природных полимеров, таких как, альгинаты, а также модифицированной микрокристаллической целлюлозы.

Микрокристаллическая целлюлоза не содержит функциональных групп и поэтому имеет неизбирательную и относительно невысокую сорбционную активность. Напротив пектины и альгинаты представляют собой природные полиэлектролиты, имеющие в своем составе карбоксильные группы и, по этой причине являются весьма эффективными сор-

бентами. Проведение модификации целлюлозы с целью придания ей полиэлектролитных свойств позволит увеличить сорбционную активность и повысить избирательность природного полимера [4].

Поэтому представляется вполне обоснованным использование модифицированных полисахаридов (целлюлозы) для использования их в качестве сорбентов и адъювантов при конструировании вакцин.

Цель настоящих исследований – изучить сорбционную активность сорбентов на основе полисахаридов растительного происхождения.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Микрокристаллическая целлюлоза была получена по традиционной схеме: гидролиз нативной древесной целлюлозы в кислой среде до порошкового состояния, затем полученный продукт отделяли на фильтре и тщательно отмывали дистиллированной водой до нейтральной pH промывных вод. После промывки материал высушивали в сушильной шкафу при 105 °С в течение 3-4 часов. При этом высушенная микрокристаллическая целлюлоза представляет собой неоднородную массу слипшихся при сушке агрегатов частиц. В определенных пропорциях данный продукт смешивали с альгинатом натрия (кремовый порошковый продукт, состоящий из чешуек различного размера, от менее 1 мм до 2-3 мм). Полученную смесь помещали в лабораторную мельницу для размола твердых материалов «IKA» и после непродолжительной, но интенсивной обработки получали однородную по цвету и составу порошковую массу.

Для изготовления готовой формы адъюванта-энтеросорбента приготовленна композиция из природных полимеров, представляющая собой двухкомпонентную систем, которая состоит из твердой фазы (микрокристаллическая целлюлоза) и растворимого компонента – альгината натрия. Композиции готовили следующим образом: по традиционной схеме получали микрокристаллическую целлюлозу гидролизом древесной целлюлозы в кислой среде до порошкового состояния, затем полученный продукт отделяли на фильтре и тщательно отмывали дистиллированной водой до нейтрального показателя pH промывных вод. После промывки материал высушивали в сушильной шкафу при 105 °С в течение 3-4 часов. При этом высушенная микрокристаллическая целлюлоза представляет собой неоднородную массу слипшихся при сушке агрегатов частиц. В определенных пропорциях данный продукт смешивали с альгинатом натрия (кремовый порошковый продукт, состоящий из чешуек различного размера, от менее 1 мм до 2-3 мм). Полученную смесь помещали в лабораторную мельницу для размола твердых материалов «IKA» и после непродолжительной, но интенсивной обработки получали однородную по цвету и составу порошковую массу. Параллельно приготовили еще образец, однако в этом случае совмещение компонентов проводили в водной среде, потому, что альгинат натрия хорошо набухает и образует вязкий раствор. В полученный раствор погружали микрокристаллическую целлюлозу, затем смесь диспергировали в высокооборотистом лабораторном гомогенизаторе Waring Blender. Приготовленную однородную массу выливали на поддон и сушили в сушильном шкафу при 105°С в течение 5-6 часов. Затем осуществляли размол в мельнице до получения однородного порошкового продукта. В результате таких операций получали продукт частицы, которого имели нерастворимое ядро и были покрыты высокомолекулярным компонентом, хорошо набухающим в воде и содержащий функциональные группы (карбоксилатные) [4].

Определение сорбционной способности природных полисахаридов оценивали по связыванию метиленового голубого

[5]. Для этого навеску препарата массой 0,3 г, в расчете на воздушно-сухой исследуемый материал, заливали 50 мл водного раствора красителя заданной концентрации (от 0,4 до 3,4 г/л). Растворы имели pH = 6. По истечении трех часов (период установления сорбционно-десорбционного равновесия) сорбент отделяли от раствора центрифугированием. Далее проводили необходимое (количественно контролируемое) разбавление раствора и определение его оптической плотности. По предварительно построенному калибровочному графику зависимости оптической плотности раствора от его концентрации определяли равновесную концентрацию метиленового голубого и рассчитывали величину сорбции по формуле:

$A=((Co-Cr)/g) \times V$, мг/г,

где: C_0 - начальная концентрация метиленового голубого (мг/л),

C_r - равновесная концентрация метиленового голубого (мг/л),

V - исследуемый объем (л),

g - навеска сухого вещества (г).

Для оценки сорбционной способности различных образцов активированной целлюлозы в работе использовали вакцинные штаммы вируса инфекционного ринотрахеита (КМИЭВ-6) и вируса диареи (КМИЭВ – 7) крупного рогатого скота и сорбенты.

Для выявления генома вируса инфекционного ринотрахеита (ИРТ) использовали разработанную нами тест-систему для постановки ПЦР в реальном времени (ТУ BY 600049853.120-2009), а для выявления генома вируса диареи (ВД) - тест-систему производства НПО «Нарвак» (Россия).

Постановку ПЦР проводили в real-time амплификаторе «Bio-Rad IQ5»(США).

Оценку сорбционной активности сорбентов на основе природных полисахаридов проводили путем их объединения с вируссодержащей жидкостью вирусов ИРТ и ВД. Процесс сорбции продолжался в течение 24 часов при температуре 37^0 С, после чего путем центрифугирования отделяли вирус от сорбента. В надосадочной жидкости определяли наличие ДНК вируса ИРТ и РНК вируса диареи путем постановки Real-Time ПЦР [3].

Оценку сорбционной способности адъювантов в отношении микроэлементов проводили с помощью атомно-адсорбционной хроматографии с использование сульфата цинка и сульфата меди. Для этого готовили разведения солей тяжелых металлов в концентрации 500 и 5000 мг/л. Каждое разведение солей металлов соединяли в равных соотношениях с адъювантом в рабочей концентрации. Процесс сорбции продолжался в течение 24 часов при температуре $+2+4^0$ С, После центрифугирования сорбента и солей металлов из надосадка проводили отбор проб. В надосадочной жидкости определяли концентрацию меди и цинка.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Приготовленные композиты из природных полимеров представляют собой двухкомпонентные системы, состоящие из твердой фазы (микрокристаллическая целлюлоза) и растворимого компонента – альгината натрия. Микрокристаллическая целлюлоза не обладает выраженными ионоселективными свойствами, однако, благодаря порошковой форме она имеет развитую удельную поверхность. С цель увеличения сорбционных свойств данного продукта вводили второй компонент – альгинат натрия, имеющий высокое содержание карбоксильных групп.

При оценке сорбционной способности в качестве сорбата в работе было выбрано вещество, моделирующее эндогенный токсин, а именно: краситель метиленовый голубой, который сорбируется предположительно по механизму ионного обмена. Результаты сорбции метиленового голубого из его водных растворов образцами представлены в табл. 1.

Проведенные испытания опытных

Рис. 1. Растровые электронные фотографии целлюлозных образцов: *а* – волокна целлюлозы, *б* – частицы микрокристаллической окисленной целлюлозы

Рис. 2. Порошковая основа энтеросорбента

Таблица 1

Оценка сорбционной способности опытных образцов по связыванию метиленового голубого (продолжительность взаимодействия - 3 часа)

Сорбент	Величина сорбции, мг/г
Микрокристаллическая целлюлоза	0,8
Альгинат натрия	64,0
Микрокристаллическая целлюлоза в смеси с альгинатом натрия в пропорции 50:50 (приготовлен по «сухому» способу)	110,3
Микрокристаллическая целлюлоза в смеси с альгинатом натрия в пропорции 50:50 (приготовлен по «мокрому» способу)	111,5

образов на способность связывать модельный токсикант – метиленовый голубой показали, что за 3 часа взаимодействия микрокристаллическая целлюлоза способна связать всего лишь 0,8 мг красителя на грамм препарата, тогда как модифицированный образец имеет величину сорбции 63,8 мг/г. Но сорбционная способность приготовленных препаратов № 1 и №2 более, чем на два порядка превосходит таковую микрокристаллической целлюлозы.

В табл. 2 представлены изучения активности сорбентов на основе активированной целлюлозы в отношении вирусов ИРТ и диареи.

Результаты проведенных исследований показали, что микрокристаллическая целлюлоза в смеси с альгинатом натрия в пропорции 50:50 как по мокрому, так и по сухому методу обладают высокими сорбционными свойствами.

Следующим этапом работы явилось изучение сорбционных свойств полученных образцов модифицированной целлюлозы в отношении солей тяжелых металлов (сульфат цинка и сульфат меди)

Оценку сорбционной способности адъювантов в отношении микроэлементов проводили с помощью атомно-адсорбционной хроматографии с использование сульфата цинка и сульфата меди.

Результаты определения сорбционной активности различных полисахаридов в отношении солей металлов приведены в табл. 3.

Приведенные результаты показывают, что разработанные новые сорбенты на основе целлюлозы обладают высокой сорбционной активностью и их в дальнейшем можно использовать в качестве адъюванта для вакцин или энтеросорбентов. Степень сорбции вышеуказанных полисахаридов составляет от 236 до 937.

Таблица 2

Изучение активности сорбентов на основе активированной целлюлозы в отношении вирусов ИРТ и диареи

№ п/п	Название сорбента	Степень сорбции	
		Вирус ИРТ	Вирус диареи
1.	Микрокристаллическая целлюлоза	34	4,1
2.	Альгинат натрия	$1,98x10^4$	9,7
3.	Микрокристаллическая целлюлоза в смеси с альгинатом натрия в пропорции 50:50 (приготовлен по «сухому» способу)	$4,72x10^4$	90,7
4.	Микрокристаллическая целлюлоза в смеси с альгинатом натрия в пропорции 50:50 (приготовлен по «мокрому» способу)	$1,03x10^7$	159,7

Достоверность: * - $P \leq 0,01$

Таблица 3

Результаты определения сорбционной активности различных сорбентов в отношении солей металлов

№ п/п	Название сорбента	Концентрация меди / степень сорбции		Концентрация цинка / степень сорбции	
1.	Микрокристаллическая целлюлоза	5130/1,02	507/1,04	5704/0,92	486/1,08
2.	Альгинат натрия	5536/0,94	513/1,03	4346/1,28	569/0,92
3.	Микрокристаллическая целлюлоза в смеси с альгинатом натрия в пропорции 50:50 (приготовлен по «сухому» способу)	3638/1,44	161/3,26	3386/1,55	390/1,35
7.	Микрокристаллическая целлюлоза в смеси с альгинатом натрия в пропорции 50:50 (приготовлен по «мокрому» способу)	3916/1,34	116/4,53	4257/1,23	332/1,58
13	Исходная концентрация металла	5250	525	2520	525

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

- Разработана технология приготовления новых сорбентов на основе микрокристаллической целлюлозы в смеси с альгинатом натрия в пропорции 50:50 приготовленной по «сухому» и «мокрому» способам.
- Оценка активности сорбентов на основе микрокристаллической целлюлозы в смеси с альгинатом натрия показало их высокую сорбционную способность активность в отношении метиленового голубого, тяжелых металлов, вирусов инфекционного ринотрахеита и диареи.

Studying of sorption properties of polysaccharides of the phytogenesis

P. Krasochko, F.Kaputsky, P. Krasochko, O. Zubets, T. Aladyeva.

ABSTRACT

Results of studying of sorption properties of microcrystalline cellulose are given in a mix with sodium alginate in a proportion 50:50 prepared on "dry" and "wet" ways. It is shown that samples of cellulose have high sorption activity concerning methylene blue, heavy metals, viruses of infectious rhinotracheitis and diarrhea.

Key words: the activated cellulose, sorbents, heavy metals, virus of infectious rhinotracheitis, diarrhea virus, polymerase chain reaction.

ЛИТЕРАТУРА

1. Беляков Н.А. Энтеросорбция - механизм лечебного действия // Эфферентная терапия. – 1997. – Т3. –№2. – С. 20-26.
2. Дудкин М.С. Пищевые волокна. – К.: Урожай. – 1988. –152с.
3. Максимович В.В. Методические указания по диагностике инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота методом полимеразной цепной реакции // Изд. РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н.Вышелесского». - Минск. -2008. –26с.
4. Ермоленко И.*Н.* Спектроскопия в химии окисленных целлюлоз: монография. – Минск: Изд. АН. БССР. –1959. –291с.
5. Пакшвар А.Б., Конкина А.А. Контроль производства химических волокон. – М.: Химия. – 1967. –280 с.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ФАРМАКОЛОГИЯ

УДК: 614

ПРИОБРЕТЕНИЕ ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ: КАК ВЫБРАТЬ ПИТОМНИК, ИСХОДЯ ИЗ РОССИЙСКИХ РЕАЛИЙ. СООБЩЕНИЕ 2. ТРЕБОВАНИЯ К ПОСТАВЩИКАМ

Фатеева Е.И.- к.б.н., курирующий ветеринарный врач,
НПП «Питомник лабораторных животных»

РЕФЕРАТ

Ограниченный выбор питомников в России часто вынуждает исследователей разводить лабораторных животных собственными силами. Однако, для проведения исследований на современном уровне, требуются животные высокого качества. Для того, чтобы оценить добросовестность поставщика животных, можно использовать несложные опросные листы. Одна часть вопросов касается генетики животных, которых разводят в питомнике (проводится ли фенотипирование, доступна ли кривая вес/возраст), другая – их здоровья (например, ведется ли в питомнике наблюдение за состоянием здоровья животных, и есть ли в штате ветеринарный врач). В российских условиях не всегда можно доверять представленным документам, поэтому очень важно, чтобы питомники обсуждали с покупателями возможность проведения инспекции, и находили способы отвечать на вопросы, интересующие покупателя.

Ключевые слова: питомник лабораторных животных, лабораторные животные, инспектирование питомника, клинический осмотр, условия содержания, программа профилактики здоровья.

В России, к сожалению, на сегодняшний день существует весьма ограниченный выбор поставщиков. Это либо единственный питомник СПФ-животных, либо питомники Академии медицинских наук, организованные много лет назад и существующие на том же уровне. В последние годы появляются частные питомники, которые предлагают лабораторных животных, особенно мелких грызунов и кроликов. Как не ошибиться в выборе?

Первый вопрос, который следует за-