

Т.В.Аленкина, М.В.Овчинникова, М.Н.Киреев, А.К.Никифоров

**ПЕРСПЕКТИВНЫЕ СОРБЦИОННЫЕ МАТРИЦЫ ДЛЯ КОНСТРУИРОВАНИЯ АНТИТОКСИЧЕСКОГО ХОЛЕРНОГО ЭНТЕРОСОРБЕНТА**

*ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов, Российская Федерация*

Экспериментально определена возможность конструирования пероральных противохолерных препаратов на основе сорбционных матриц с иммобилизованным специфическим лигандом. В качестве сорбционных матриц были выбраны представители различных групп энтеросорбентов – активированный уголь, полисорб, полифепан, хитозан. Иммобилизацию специфического лиганда – антитоксических иммуноглобулинов (АТ/ИГ) – осуществляли методом адсорбции. В тестах *in vivo* токсиннейтрализующая активность иммобилизованных антитоксических антител на полисорбе определялась в разведении 1:64000, на активированном угле, полифепане и хитозане – 1:32000, специфическая активность *in vitro* в ДИА составила 1:10000 и 1:5000 соответственно. Высокие показатели токсиннейтрализующей и специфической активности продемонстрировали пригодность всех испытанных сорбционных матриц для конструирования антитоксических холерных энтеросорбентов. По изученным характеристикам и параметрам определены наиболее перспективные сорбционные матрицы – полисорб и хитозан. Для стабилизации свойств полученных экспериментальных образцов сорбентов АТ/ИГ–полисорб и АТ/ИГ–хитозан был применен метод лиофилизации со стабилизатором гликоколом. Высушенные образцы сохраняли биологические свойства на исходном уровне.

*Ключевые слова:* энтеросорбенты, холерный токсин, сорбционные матрицы, антитоксические иммуноглобулины.

T.V.Alenkina, M.V.Ovchinnikova, M.N.Kireev, A.K.Nikiforov

**Prospective Sorption Matrices for Antitoxic Cholera Enterosorbent Constructing**

*Russian Research Anti-Plague Institute “Microbe”, Saratov, Russian Federation*

Demonstrated is the possibility of constructing of oral anti-cholera preparations based on sorption matrices with immobilized specific ligand. Various enterosorbents (activated charcoal, polysorb, polyfepan, and chitosan) have been used as sorption matrices, cholera antitoxic immunoglobulins (ATIg) – as specific ligands. Toxin-neutralizing activity of the ATIg immobilized on polysorb has been observed *in vivo* in 1:64000 dilutions and that of ATIg immobilized on activated charcoal, polyfepan, and chitosan – in 1:32000. Their specific activity *in vitro* has been defined in dot-blot immunoassay in 1:10000 and 1:5000 dilutions, respectively. High toxin-neutralizing activity, as well as specific one has proved the suitability of all tested matrices for antitoxic cholera enterosorbents constructing. However, polysorb and chitosan are accepted to be the most prospective matrices in view of the studied characteristics and properties. To stabilize the properties of the obtained experimental prototype sorbents, AT/Ig-polysorb and AT/Ig- chitosan, applied has been the method of liophilisation with glycochol stabilizer. Dried samples retain their original biological properties.

*Key words:* enterosorbents, cholera toxin, sorption matrices, antitoxic immunoglobulins.

Известно, что в основе патогенеза холеры лежат механизмы, связанные с воздействием токсинов возбудителя на энтероциты кишечника и биохимические системы внутри клетки. Поэтому основу лечения холеры составляет патогенетическая терапия, целью которой является восстановление и сохранение водно-электролитного равновесия в организме. Этиотропная терапия при холере не играет решающей роли, но повышает эффективность регидратационных мероприятий: уменьшает длительность и объемы диареи, сокращает сроки вибриононосительства [8]. Однако применение антибиотиков и химиопрепаратов часто ограничивается лекарственной устойчивостью возбудителя, а также наличием противопоказаний к применению и частотой побочных реакций со стороны макроорганизма [9, 10].

Своевременно проведенная в полном объеме терапия позволяет свести летальность к минимуму. В то же время, наибольшего уровня летальность при холере достигает, как правило, в начале крупных эпидемических вспышек, особенно возникших в результате природных катастроф, что связано с отсутствием в этот период достаточного количества регидратационных растворов для внутривенного введения, низкой эффективностью антибактериальных средств при выраженных симптомах гастроэнтерита, трудностями в оказании экстренной помощи при массовом поступлении больных, проблемами в организации неотложного лечения. Поэтому по-прежнему актуальна разработка и внедрение в практику новых высокоэффективных лекарственных препаратов детоксикационного и антимикробного действия, безопас-

ных и простых в применении.

В последнее время для лечения и профилактики ряда инфекционных заболеваний желудочно-кишечного тракта стали широко применяться энтеросорбенты, которые, по мнению многих авторов, являются перспективным лекарственным средством [2]. Лечебный эффект энтеросорбентов осуществляется в результате их прямого и опосредованного действия на патогенетические механизмы. Вследствие этого эфферентная терапия при кишечных заболеваниях является вполне обоснованной. Раннее применение энтеросорбентов оказывает быстрый и выраженный дезинтоксикационный, гипотермический и антидиарейный клинический эффект [6]. Доказано, что при среднетяжелых и легких формах острых кишечных инфекций эффективность энтеросорбентов не уступает широко используемым в клинической практике антибактериальным препаратам [9].

Однако большинство используемых энтеросорбентов характеризуются ограниченной способностью сорбировать бактериальные токсины и микробные клетки, а также отсутствием специфического механизма нейтрализации токсических веществ. Перспективным направлением является придание сорбентам специфических свойств путем иммобилизации на их поверхности различных лигандов и лекарственных субстанций. Благодаря структуре матрицы и большой связывающей способности иммобилизованные компоненты могут в значительных и дозируемых количествах удерживаться носителем. При применении в лечебной практике они будут в определенных условиях легко десорбироваться с матрицы и оказывать свое действие на макроорганизм.

Целью нашего исследования являлась сравнительная оценка сорбционных свойств различных сорбентов для выбора оптимальной матрицы, пригодной для конструирования специфического энтеросорбционного противохолерного препарата.

### Материалы и методы

Для работы были выбраны различные по химической структуре сорбционные матрицы, являющиеся яркими представителями основных групп сорбентов:

- активированный уголь (ОАО «Ирбитский химико-фармацевтический завод», Россия, Р№ 002061/01) – углеродный сорбент с размером частиц от 0,1 до 0,5 мм и площадью активной сорбирующей поверхности на 1 г вещества 1,5–2 м<sup>2</sup>;

- полисорб-МП (кремния диоксид коллоидный) (ЗАО «Полисорб», Россия, Р№ 001140/01-100908) – кремнийсодержащий сорбент с размером частиц 5–20 нм и площадью сорбирующей поверхности  $\geq 400$  м<sup>2</sup> на 1 г;

- полифепан (ЗАО «Сайнтекс», Россия, Р№ 01047/02) – порошкообразный природный органический сорбент на основе лигнина гидролизного, размер частиц 0,3–0,5 мм, активная сорбирующая

поверхность 16–20 м<sup>2</sup> на 1 г;

- хитозан (1,4-β-D-глюкан) (ЗАО «Биопрогресс», Россия) – порошкообразный полимер животного происхождения, получаемый реакцией дезацетилирования хитина, размер частиц от 1 до 150 мкм, сорбирующая поверхность 100–250 м<sup>2</sup> на 1 г.

Активированный уголь, полисорб-МП и полифепан зарегистрированы в Российской Федерации и разрешены к применению в качестве энтеросорбирующих средств [8]. Хитозан широко применяется как биологически активная добавка к пище [3].

В работе был использован хитозан с молекулярной массой 200 кДа, степенью дезацетилирования 90 %. Частицы хитозана получали методом ионотропного гелеобразования [5]. К раствору хитозана в 1,5 % уксусной кислоте добавляли дробно 10 % раствор сульфата натрия до образования опалесценции. Полученные частицы отделяли центрифугированием 30 мин при 3000 об/мин. Выход частиц составлял 8–10 %.

Таблетки активированного угля измельчали растиранием в ступке до тонкодисперсного состояния. Полисорб и полифепан не подвергались предварительной обработке.

В качестве лиганда были использованы антитоксические иммуноглобулины (АТ/ИГ), полученные из сыворотки крови кроликов породы шиншилла, иммунизированных очищенным холерным токсином, прошедшим контроль специфической стерильности. Выделение иммуноглобулинов осуществляли путем фракционирования 3 М раствором сернокислого аммония с последующим отделением сформировавшегося осадка центрифугированием и освобождением глобулиновой фракции от сернокислого аммония методом гель-хроматографии на колонке с сефадексом G-50.

Концентрация белка (определяли спектрофотометрически при длине волны 260 и 280 нм) составляла 45,15 мг/мл. Содержание кожных антитоксических единиц по Крейгу – 16000 в 1 мл. Специфическая активность в дот-иммуноанализе (ДИА) – 1:2000, реакции диффузной преципитации (РДП) – 1:64. Полученные иммуноглобулины в РДП и ДИА не давали кросс-реакций с О-антигеном Буавена.

Иммобилизацию лигандов на сорбционных матрицах осуществляли методом адсорбции. Образцы сорбентов помещали в стеклянную химическую посуду, добавляли раствор иммуноглобулинов в соотношении 1:5 (вес/объем). Взвеси инкубировали при комнатной температуре в течение 1,5–2 ч при постоянном перемешивании на магнитной мешалке, после чего осадок отделяли центрифугированием, а затем дважды отмывали 1,5 М раствором натрия хлорида.

Способность иммобилизованных антитоксических иммуноглобулинов взаимодействовать с холерным токсином изучали в тестах *in vivo* и *in vitro*. Токсиннейтрализующую активность определяли в кожной пробе Крейга. Для этого из 10 % суспензий полученных сорбентов делали ряд последователь-

ных двукратных разведений в 1,5 М растворе натрия хлорида, затем к 0,2 мл каждого разведения добавляли 0,2 мл рабочего разведения холерного токсина, содержащего 2 кожные дозы в 1 мл. Смесь инкубировали 1 ч при 37 °С и вводили внутривожно в депилированную кожу кроликов породы шиншилла весом 2,5–3 кг. В качестве контроля использовали 2 кожные дозы холерного токсина в том же объеме.

Специфическую активность лиганда *in vitro* определяли в ДИА и РДП. РДП проводили в 1 % агаровом геле («Difco», США). В центральную лунку вносили 0,1 мл холерного токсина в концентрации по белку 1 мг/мл, в периферические лунки – последовательные разведения 10 % суспензий полученных образцов от 1:2 до 1:64. Реакцию учитывали визуально через 24–48 ч по сформировавшимся линиям преципитации.

Постановку ДИА осуществляли на нитроцеллюлозных мембранах 0,22 мкм («Millipore», США), сенсibilизированных холерным токсином в концентрации 2 мкг/мл в фосфатно-солевом буфере (ФСБ) рН (7,3±0,1) в течение 2 ч при температуре 37 °С. Неспецифические связи блокировали 3 % раствором бычьего сывороточного альбумина (БСА) на ФСБ. Разведения исследуемых образцов наносили в объеме 2 мкл. Мембраны инкубировали 1 ч при температуре 37 °С. Реакцию проявляли протеином А, сорбционно связанным с гидрозолем золота (размер частиц 15–17 нм). Результаты учитывали визуально.

### Результаты и обсуждение

Одним из основных требований к сорбционным матрицам является высокая сорбционная емкость (активность). В связи с чем, первым этапом работы было определение данного параметра у взятых в эксперимент образцов.

Для расчета сорбционной емкости определяли содержание непрореагировавшего белка в супернатанте, который рассчитывали по формуле Калькара [8]:

$$X = 1,45 \times D_{(280)} - 0,75 \times D_{(260)}$$

где X – содержание белка, мг/мл;  $D_{(280)}$  – оптическая плотность раствора при длине волны 280 нм;  $D_{(260)}$  – оптическая плотность раствора при длине волны 260 нм.

Сорбционную емкость сорбентов определяли по формуле:

$$A = \frac{(C_n - C_k) \times V}{m}$$

где  $C_n$  – начальная концентрация белка в растворе, мг/мл;  $C_k$  – конечная концентрация белка в растворе, мг/мл; m – навеска сорбента, г; V – объем раствора белка, л.

Степень извлечения белка из раствора определяли по формуле:

$$L = \frac{(C_n - C_k) \times 100 \%}{C_n}$$

В результате проведенных экспериментов установлено, что наибольшей сорбционной емкостью и степенью извлечения белка по отношению к анти-токсическим иммуноглобулинам обладал полисорб. Значения изучаемых параметров составили 44,65 мг/мл и 98,89 % соответственно.

Сорбционная емкость и степень извлечения белка у полифепана и хитозана находились на уровне 37,55 мг/мл, 83,2 % и 21,6 мг/мл, 52,15 % соответственно. Уголь активированный характеризовался наименьшими значениями указанных параметров – 16,95 мг/мл, 37,5 %.

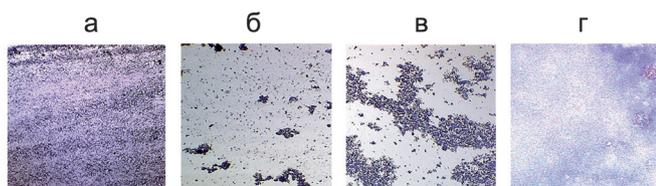
Следующим этапом нашей работы было изучение специфической активности лиганда. Токсин-нейтрализующая активность иммуноглобулинов иммобилизованных на полисорбе (АТ/ИГ–полисорб) определялась в разведении 1:64000, на сорбентах 1, 3 и 4 – 1:32000. Специфическая активность АТ/ИГ–полисорб в ДИА составила 1:10000, на активированном угле, полифепане и хитозане – 1:5000. Реакция диффузной преципитации была отрицательна для всех испытуемых образцов, что свидетельствовало об отсутствии свободных антительных компонентов в системе сорбент-иммуноглобулин.

Полученные результаты объясняются, прежде всего, структурными особенностями сорбционных матриц. Так, основным свойством гранулированных углеродных энтеросорбентов является наличие развитой внутренней структуры, обеспечивающей большую площадь взаимодействия [1]. Угольные сорбенты обладают достаточно мощной системой транспортных пор и, следовательно, хорошей кинетикой сорбции. Однако эти свойства проявляются в отношении веществ с молекулярной массой порядка 10–30 кДа. Молекулярная масса иммуноглобулинов находится в пределах 150–1000 кДа, что и определяет низкие показатели сорбционного процесса.

Присутствие в составе полифепана двух мезопористых структур предполагает успешную адсорбцию крупных глобул биологически активных веществ [6], но наличие в этих структурах полярных и неполярных функциональных групп приводит к конкурентному взаимодействию молекул селективного компонента и растворителя и, как следствие, к снижению показателей адсорбционной активности.

Высокая сорбционная активность хитозана обусловлена наличием в его молекуле реакционноспособных amino- и гидроксильных групп [4], что определяет его способность связывать значительные количества органических водорастворимых веществ.

Адсорбция белковых молекул на полисорбе обеспечивается на поверхности сорбционной матрицы, а не в порах, как у большинства других сорбентов. Активные центры на поверхности частиц сверхдисперсных кремнеземов представлены, в основном, Si–ОН группами, с которыми происходит взаимодействие пептидных групп в структуре белка [6], что обеспечивает высокие показатели иммобилизации анти-токсических иммуноглобулинов на данном сорбенте.



Изучение агрегационной способности антитоксических сорбентов (USB DigiMicro Scale x200):

а – уголь активированный; б – полифепан; в – полисорб; г – хитозан

Важной характеристикой для любых сорбционных матриц, а для матриц с иммобилизованным биологически активным компонентом особенно, является способность к агрегации. Изучение указанных свойств полученных образцов антитоксических сорбентов с помощью цифрового микроскопа USB DigiMicro Scale при увеличении в 200 раз (рисунок) показало, что специфические сорбенты на основе активированного угля (а) и хитозана (г) представляют собой более однородные суспензии, в то время как полифепан (б) и полисорб (в) склонны к образованию крупных агрегатов.

При разработке систем доставки биологически активных веществ большое внимание следует уделять стабильности при хранении без потери биологической активности. Изучение свойств полученных сорбентов показало, что их взвеси в 1,5 М растворе натрия хлорида находятся в состоянии динамического равновесия, то есть в жидкой среде происходят процессы сорбции-десорбции иммуноглобулинов. При этом доля десорбируемых иммуноглобулинов составляла в среднем для угля активированного 22,18, полифепана – 22,7, полисорба – 14,17, хитозана – 8,4 %.

Для стабилизации свойств полученных сорбентов был применен метод лиофилизации на сублимационной установке Heto PowerDry PL 9000/-50/-90/HSC («Heto-Holten», Дания), продолжительностью 24 ч. В качестве модельных объектов были выбраны АТ/ИГ–полисорб и АТ/ИГ–хитозан. В качестве стабилизатора использовали гликокол. Лиофилизированные образцы представляли собой хорошо сформированные пористые таблетки, растворявшиеся в воде в течение 1 мин. Изучение специфической активности лиофилизированных образцов АТ/ИГ–полисорба и АТ/ИГ–хитозана в ДИА доказало сохранение их биологических свойств на исходном уровне 1:10000 и 1:5000 соответственно.

Таким образом, сравнительный анализ физико-химических и биологических свойств четырех сорбционных матриц показал, что все они пригодны для конструирования антитоксических энтеросорбентов. Однако, по нашему мнению, перспективными для дальнейшей работы все-таки являются полисорб, продемонстрировавший самые высокие показатели сорбционной емкости, степени извлечения белка,

специфической активности, и хитозан, главным преимуществом которого, несмотря на его умеренную сорбционную активность, является стабильность свойств суспензии, нетоксичность, биосовместимость и биodeградируемость.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бакалинская О.Н., Коваль Н.М., Картель Н.Т. Получение углеродных сорбентов с биоспецифической активностью. Эфферентная терапия. 2003; 9(2):16–22.
2. Беляков Н.А., Соломенников А.В. Энтеросорбция – механизм лечебного действия. Эфферентная терапия. 1997; 3(2):15–8.
3. Богдашова И.Н., Насибов С.М., Куклин Е.Ю., Приходько А.А. Использование хитозана и его продуктов при воспалительных заболеваниях желудочно-кишечного тракта. В кн.: Хитин и хитозан. Получение, свойства и применение. М.: Наука; 2002. С. 280–301.
4. Гамзазаде А.И., Насибов С.М., Никитин Л.Н. Модификация хитозана с использованием диоксида углерода. Сверхкритические флюиды: Теория и практика. 2006; 1(2):60–8.
5. Зубарева А.А., Курек Д.В., Сизова С.В., Свирищевская Е.В., Варламов В.П. Определение физико-химических параметров наночастиц модифицированного хитозана. Российские технологии. 2012; 7(7–8):102–6.
6. Николаев В.Г. Энтеросорбция: состояние вопроса и перспективы на будущее. Вестник пробл. биол. и мед. 2007; 4:7–17.
7. Северин С.Е., Соловьева А.Г., редакторы. Практикум по биохимии: уч. пособие. 2-е изд. М.: Изд-во МГУ; 1989. С. 83–4.
8. Сундуков А.В., Аликеева Г.К., Кожеевникова Г.М., Юшук Н.Д., Сафулина Н.Х. Холера. Лечащий врач. 2011; 10:50–4.
9. Токмалаев А.К. Применение энтеросорбентов в лечении острых кишечных инфекций. Лечащий врач. 2011; 5:12–8.
10. Юшук Н.Д., Розенблюм А.Ю. Синдром поражения желудочно-кишечного тракта при инфекционных болезнях. В кн.: Инфекционные болезни: национальное руководство. М.: ГЭОТАР-Медия; 2007. С. 276–82.

#### References

1. Bakalinskaya O.N., Koval' N.M., Kartel' N.T. [Obtainment of carbon-based sorbents with bio-specific activity]. Efferentnaya Terapiya. 2003; 9(2):16–22.
2. Belyakov N.A., Solomennikov A.V. [Enterisorption – a mechanism of the curative action]. Efferentnaya Terapiya. 1997; 3(2):15–8.
3. Bol'shakov I.N., Nasibov S.M., Kuklin E.Yu., Prokhod'ko A.A. [Application of chitosan and its products in case of inflammatory gastrointestinal tract diseases]. In: [Chitine and Chitosan. Obtainment, Properties, and Application]. M.: Nauka; 2002. P. 280–301.
4. Gamzazade A.I., Nasibov S.M., Nikitin L.N. [Chitosan modification using carbon dioxide]. Sverkhkritich. Flyuidy: Teoriya i Praktika. 2006; 1(2):60–8.
5. Zubareva A.A., Kurek D.V., Sizova S.V., Svirshchevskaya E.V., Varlamov V.P. [Specification of physical-chemical characteristics of the modified chitosan nanoparticles]. Rossiyskie Tekhnologii. 2012; 7(7–8): 102–6.
6. Nikolaev V.G. [Enterisorption: current state of the issue and prospective]. Vestnik Probl. Biol. Med. 2007; 4:7–17.
7. Severin S.E., Solov'eva A.G., editors. [Practice Guidelines on Biochemistry: Tutorial. 2-nd Edition]. M.: MSU Publishing House; 1989. P. 83–4.
8. Sundukov A.V., Alikeeva G.K., Kozhevnikova G.M., Yushchuk N.D., Safulina N.Kh. [Cholera]. Lechashchiy Vrach. 2011; 10:50–4.
9. Tokmalaev A.K. [Application of enterosorbents for treating acute intestinal infections]. Lechashchiy Vrach. 2011; 5:12–8.
10. Yushchuk N.D., Rozenblyum A.Yu. [Gastrointestinal tract disorder syndrome in case of infectious diseases]. In: [Infectious Diseases: National Guidelines]. M.: GEOTAR-Media; 2007. P. 276–82.

#### Authors:

Alenkina T.V., Ovchinnikova M.V., Kireev M.N., Nikiforov A.K. Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe". 46, Universitetskaya St., Saratov, 410005, Russian Federation. E-mail: rusrap@microbe.ru

#### Об авторах:

Аленкина Т.В., Овчинникова М.В., Киреев М.Н., Никифоров А.К. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». Российская Федерация, 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: rusrap@microbe.ru

Поступила 28.11.12.