

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

СОРБЦИОННЫЕ СВОЙСТВА ПОЛИМЕРНОГО ЭНТЕРОСОРБЕНТА И ЕГО СПЕЦИФИЧЕСКОГО МОДИФИКАНТА В МОДЕЛЬНЫХ РАСТВОРАХ ХОЛЕРНОГО ТОКСИНА *IN VITRO*

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

Проведено сравнительное изучение сорбционных свойств полимерного энтеросорбента хитозана и его специфического модификанта, полученного методом адсорбции антитоксических иммуноглобулинов на растворимой хитозановой матрице. Установлено, что растворимая форма хитозана и его специфический модификант проявляли высокую адсорбционную активность в отношении холерного токсина, снижая его исходную концентрацию. Равновесная емкость хитозана и его модификанта возрастала с увеличением исходных концентраций холерного токсина в растворе. В статических условиях изучали степень извлечения холерного токсина из раствора. В динамике фиксировали скорость извлечения адсорбата из раствора. В ходе проведенных экспериментов доказана эффективность специфической сорбции модифицированного сорбента, обусловленная наличием в его структуре активного компонента – антитоксических противохолерных иммуноглобулинов. Полученные данные представляют интерес в плане дальнейшей разработки специфического противохолерного энтеросорбента.

Ключевые слова: энтеросорбенты, природные полисахариды, хитозан, холерный токсин, специфическая сорбция, модельные растворы.

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

Sorption Properties of Polymeric Enterosorbent and Its Specific Modified Analogue in Simulated Cholera Toxin Solutions *in vitro*

Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov, Russian Federation

Carried out was comparative study of the sorption properties in polymeric enterosorbent – chitosan, and its specific modified analogue obtained through absorption of anti-toxin immunoglobulins onto the soluble chitosan template. It is determined that soluble chitosan and its specific counterpart express high sorption activity in relation to cholera toxin, thus making lower its initial concentrations. Equilibrium adsorption capacity of the chitosan and its modified variant increase with the raise of initial cholera toxin concentration in the solution. Cholera toxin extraction rate was identified under static conditions. Adsorbate substance recovery rate was registered in the progression. In the course of experiments proved was modified sorbent specific sorption efficiency, occasioned by the presence of the active component in the analogue composition – namely, anti-toxic anticholeraic immunoglobulins. The data obtained are of the importance for further development of specific anticholeraic enterosorbent.

Key words: enterosorbents, natural polysaccharides, chitosan, cholera toxin, specific sorption, simulated test solutions.

Острые кишечные инфекции (ОКИ) являются одной из важных проблем в мировом и отечественном здравоохранении. С одной стороны, уровень заболеваемости остается достаточно высоким, без тенденции к отчетливому снижению, с другой – отмечается появление сероваров, обуславливающих тяжелое течение болезни: *S. flexneri* 2a, энтерогеморагическая эшерихия O157, а также нетипичные штаммы *V. cholerae* O1 [9, 6]. Такие штаммы обладают высоким пандемическим потенциалом, что обеспечивается высокой адаптацией к условиям внешней среды и повышенной вирулентностью, которая выражается в более тяжелом течении заболевания с высоким показателем летальности [6].

В настоящее время в лечении ОКИ появились новые подходы – основной акцент делается на патогенетическую терапию, целью которой является дезинтоксикация, коррекция водно-электролитных изменений, нормализация моторно-секреторных функций желудочно-кишечного тракта, восстановление кишечной микрофлоры, усиление репаративных процессов в слизистой толстой кишки, энтеросорб-

ция. При инфекционных заболеваниях энтеросорбция является не только патогенетическим способом терапии, но и этиотропным, поскольку сорбенты способны поглощать как эндо- и экзотоксины возбудителей, так и фиксировать на своей поверхности бактериальные клетки и вирусы, выключая их таким образом из патологического процесса [4].

При всем многообразии энтеросорбентов несомненный интерес представляют препараты на основе природных молекул и их производных. Наиболее перспективную группу веществ составляют некрахмальные полисахариды, к которым относятся альгинаты и фукоиданы морских бурых водорослей, каррагенаны красных водорослей, пектины морских и наземных трав, хитин, его производное хитозан.

Хитозан – сополимер D-глюкозамина и N-ацетил-D-глюкозамина, имеющий уникальную поликатионную фибриллярную структуру [2]. Наличие в структуре этого полисахарида многочисленных реакционно-способных OH- и NH₂-групп создает возможность проведения разнообразной модификации и осуществления строго направленного синтеза

производных этого полимера. Дополнительно протонированная аминогруппа в молекуле хитозана является высокоактивной, что определяет его свойства связывать ионы водорода и приобретать избыточный положительный заряд, обуславливая тем самым хелато- и комплексообразующие свойства хитозана. Обилие водородных связей способствует связыванию полисахаридом большого количества органических водорастворимых веществ, в том числе бактериальных токсинов и токсинов, образующихся в толстом кишечнике в процессе пищеварения. Хитозан обладает низким раздражающим действием на слизистую оболочку кишки, мукоадгезивен, высоко биосовместим, существенно повышает биодоступность труднорастворимых веществ в крови, биодеградирует [1]. При этом хитозан имеет ряд преимуществ перед другими энтеросорбентами (например, активированным углем и каолином), не вызывая побочных эффектов при применении, таких как сорбция из организма важных питательных веществ и развитие констипационного синдрома [7].

Несмотря на опыт применения хитозана в качестве энтеросорбционного средства при лечении различных заболеваний [2, 7], вопрос его эффективности в специфической сорбции токсинов бактериальной природы остается не изученным. На современном этапе особое внимание уделяется созданию энтеросорбентов, избирательно поглощающих из организма токсические вещества белкового происхождения, накапливающиеся в результате развития различных патологических (аутоиммунных, инфекционных и др.) процессов. Применение таких препаратов позволит решить задачу целенаправленной нейтрализации токсических продуктов с последующей их элиминацией из организма.

Целью данной работы является сравнительное изучение сорбционной активности природного полисахарида хитозана и его специфического модификанта в отношении энтеротоксина холерного вибриона в условиях *in vitro*.

Материалы и методы

Для проведения экспериментов использовали хитозан (1,4-β-D-глюкан) (ЗАО «Биопрогресс», Россия): молекулярная масса 200 кДа, размер частиц от 1 до 150 мкм, сорбирующая поверхность 100–250 м² на 1 г.

Ограничения по применению хитозана связаны с его низкой растворимостью при нейтральных и слабощелочных значениях pH. Учитывая этот факт, получали растворимую форму хитозана методом осадительной коацервации. Для этого навеску полисахарида растворяли в 2,5 % растворе лимонной кислоты с последующим осаждением 10 % раствором сульфата натрия. Полученную взвесь осаждали центрифугированием. При этом образовывался гелеобразный осадок, содержащий микрочастицы хитозана размером 200–300 нм.

В качестве специфического лиганда использовали антитоксические иммуноглобулины, выделенные из сыворотки крови кроликов, иммунизированных холерным токсином. Специфическая активность взятых в эксперимент иммуноглобулинов составила в твердофазном иммуноферментном анализе и до-иммуноанализе 1:2000, в реакции иммунодиффузии – 1:64.

Специфический модификант хитозана получали методом адсорбции активного лиганда на растворимой форме сорбента. Для этого расчетное количество иммуноглобулинов соединяли с навеской энтеросорбента и оставляли на 3–5 ч при постоянном перемешивании. Затем твердую фазу отделяли центрифугированием. Контроль эффективности процесса адсорбции осуществляли измерением остаточного белка в супернатанте.

Сорбционные свойства образцов энтеросорбентов изучали в статическом и динамическом режимах *in vitro*. В эксперименте использовали модельные растворы холерного токсина в концентрациях от 10 до 100 мкг/мл.

В химическую посуду с растворами холерного токсина в указанных концентрациях добавляли по 10 мг исследуемых сорбентов. Экспозиция статического режима составила 24 ч, в динамическом режиме образцы отбирали через 1, 2, 3, 4, 5, 6 ч. Концентрацию не связавшегося холерного токсина определяли спектрофотометрически на двух длинах волн (260 и 280 нм).

Для отражения эффективности процесса сорбции определяли: количество холерного токсина в фазе сорбента $A = C_0 - C_p$, где C_0 – начальная концентрация токсина в растворе, мкг/мл, C_p – равновесная концентрация токсина, мкг/мл; равновесную емкость сорбентов $A_{max} = (C_0 - C_p) \cdot V/m$, где m – навеска сорбента, г; V – объем раствора токсина, л; степень извлечения белка из раствора $L = (C_0 - C_p)/C_0 \cdot 100 \%$.

Результаты и обсуждение

В результате проведенных исследований установлено, что энтеросорбент хитозан и его специфический модификант в статических условиях проявляли высокую адсорбционную активность по отношению к холерному токсину в модельных растворах, которая выражалась в снижении исходных концентраций адсорбата в 28,7–68,6 и 50,8–90,3 раз соответственно, в зависимости от его концентрации в реакционной смеси.

С увеличением исходных концентраций холерного токсина в растворе возрастала равновесная емкость хитозана и его модификанта. Степень извлечения белка была максимальной при высоких исходных концентрациях холерного токсина (100 мкг/мл), причем у специфического модификанта данный показатель превышал на 25 % аналогичный параметр хитозана, что свидетельствует о более высоких сорбционных свойствах специфического образца (табл. 1).

Таблица 1

Адсорбционная активность хитозана и его специфического модификанта в модельных растворах холерного токсина

Сорбент	Концентрация токсина, мкг/мл			Равновесная емкость, (A _{max})	Степень извлечения токсина из раствора (L)
	Исходная (C ₀)	В фазе раствора (C _p)	В фазе сорбента (A)		
Хитозан	10	7,13±1,5	2,87±1,1	1,09±0,9	28,7
	20	11,15±1,7	10,85±1,2	5,42±1,2	44,2
	30	12,50±1,0	17,50±1,2	8,75±1,6	58,3
	40	17,46±1,5	22,54±1,5	11,27±1,5	56,3
	50	15,91±1,5	34,09±1,0	17,04±1,6	68,1
	60	20,53±1,0	39,47±1,2	19,73±1,3	65,7
	70	21,90±1,2	48,10±1,2	24,05±1,0	68,7
	80	25,20±0,9	54,80±1,5	27,40±1,4	68,5
	90	33,27±1,5	56,73±1,7	28,36±1,5	63,0
	100	31,40±1,5	68,60±1,5	34,30±1,5	68,6
Специфический модификант	10	4,92±1,3	5,84±1,4	2,90±1,6	50,8
	20	5,45±1,0	14,66±1,2	7,30±1,6	72,7
	30	6,21±1,2	23,81±1,2	11,90±1,0	79,3
	40	5,72±1,0	34,34±1,5	17,10±1,2	85,7
	50	6,84±1,5	43,24±1,4	21,60±1,3	86,3
	60	7,25±1,7	52,86±1,4	26,23±0,8	87,9
	70	7,53±1,7	62,52±1,8	31,26±1,5	89,2
	80	8,61±1,6	71,42±1,7	34,71±1,2	89,2
	90	9,01±1,5	80,99±1,5	40,49±1,2	89,9
	100	9,70±1,5	90,30±0,8	45,15±1,5	90,3

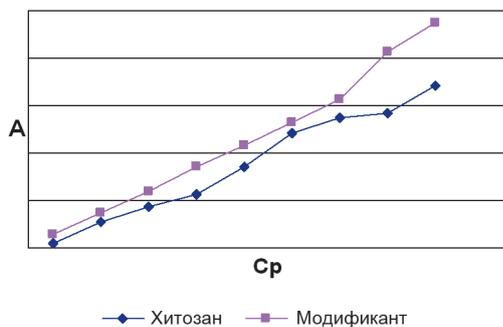
Изотермы адсорбции холерного токсина на исследуемых образцах энтеросорбентов имели S-образный вид с точками перегиба в области средних концентраций белкового адсорбата – 30 мкг/мл для хитозана и 60 – для модификанта (рисунок). Изотермы такого типа описывают полимолекулярную адсорбцию. Для набухающих полимерных сорбентов, таких как хитозан, адсорбция происходит за счет образования водородных связей и электростатических взаимодействий. При относительно малых концентрациях адсорбата происходит образование водородных связей с первичными адсорбционными центрами хитозана, его полярными амино- и гидроксильными группами, затем на менее доступных внутренних участках, причем мономолекулярный слой может быть образован не полностью. Далее каждая адсорбированная молекула сама становится центром адсорбции. При увеличении концентраций адсорбата происходит рост образовавшихся на первичных адсорбционных центрах активных кластеров, и величина адсорбции

возрастает, что на графике отражается небольшим изгибом [3].

При модификации хитозана происходит включение в активные центры сорбента молекул иммуноглобулина. Известно, что связывание антигенов происходит в щели активного центра, образованной переменными доменами в N-концевой части легкой и тяжелой цепей Fab-фрагментов. Частично контактируют с антигеном гипервариабельные участки H- и L-цепей, расположенные в местах изгибов полипептидной цепи, а также некоторые из аминокислотных остатков более глубоких внутренних областей цепи. Введение в структуру сорбента таких антигенсвязывающих центров, по нашему мнению, и приводит к специфической сорбции, которая выражается в увеличении количества извлеченного токсина из раствора. Наряду с величинами сорбции, для практических целей большое значение имеет скорость извлечения адсорбата из раствора. В связи с этим в следующей серии экспериментов исследовали динамику изменения концентрации холерного токсина в реакционной смеси при контакте с хитозаном и его специфическим модификантом.

Полученные результаты (табл. 2) свидетельствовали о том, что специфический модификант хитозана проявлял высокую скорость извлечения холерного токсина из раствора, достигая максимальной концентрации холерного токсина в фазе сорбента уже через 3 ч от начала эксперимента. Процесс сорбции холерного токсина немодифицированным хитозаном завершался через 6 ч экспозиции.

Изучение процесса сорбции-десорбции в реакционных смесях показало, что концентрация холерного токсина в фазе сорбента держалась на макси-



Изотермы сорбции холерного токсина из раствора энтеросорбентом хитозаном и его специфическим модификантом

Таблица 2

Динамика изменения концентрации холерного токсина в растворе в условиях сорбции

Энтеросорбент	Контроль концентрации, мкг/мл	Концентрация холерного токсина в фазе сорбента, мкг/мл					
		Время сорбции, ч					
		1	2	3	4	5	6
Хитозан	100	25,20	31,30	42,0	48,60	56,65	69,60
Специфический модификант	100	76,40	89,50	90,0	89,0	89,5	90,0

мальном уровне и не снижалась спустя 72 ч (срок наблюдения) от начала взаимодействия сорбента с раствором холерного токсина. Это характерно как для исходного хитозана, так и для его специфического модификанта, и свидетельствует о необратимости процесса сорбции в обоих случаях.

Таким образом, сравнительное изучение сорбционной активности (равновесная емкость, степень и скорость извлечения токсина из раствора) природного полисахарида хитозана и его специфического модификанта к холерному токсину показало количественное и временное превосходство специфического модификанта над исходным препаратом. Доказана эффективность специфической сорбции модифицированного сорбента, обусловленная наличием в его структуре активного компонента – антихолерных иммуноглобулинов.

Полученные данные *in vitro* представляют научный интерес в плане дальнейшей работы по конструированию специфического противохолерного энтеросорбента на основе хитозановой матрицы.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Большаков И.Н. Хитозановая энтеросорбция при остром уремиическом синдроме. *Современные наукоемкие технол.* 2004; 3:43–6.
2. Жоголев К.Д., Никитин В.Ю., Цыган В.Н. Препараты на основе хитина и хитозана в медицине и рациональном питании. *Мед. иммунол.* 2001; 2:316–17.

3. Зимон А.Д., Лещинко А.Ф. Коллоидная химия. М.: Агар; 2001. 317 с.
4. Мазанкова Л.Н., Павлова А.А. Совершенствование патогенетической терапии острых кишечных инфекций у детей. *Детские инф.* 2006; 4:67–9.
5. Николаев В.Г., Михаловский С.В., Николаева В.В., Олещук А.М., Лисничук Н.Е. Энтеросорбция: состояние вопроса и перспективы на будущее. *Вестник пробл. биол. и мед.* 2007; 4:7–17.
6. Онищенко Г.Г., Кутырев В.В., Шуковская Т.Н., Смирнова Н.И., Никифоров А.К., Еремин С.А., Топорков В.П. Специфическая профилактика холеры в современных условиях. *Пробл. особо опасных инф.* 2011; 1(107):5–13.
7. Скрябин К.Г., Вихорева Г.А., Варламов В.П., редакторы. Хитин и хитозан: Получение, свойства и применение. М.: Наука; 2002. 368 с.
8. Хотимченко Ю.С., Кропотов А.В. Применение энтеросорбентов в медицине. *Тихоокеанский мед. журн.* 1999; 2:84–9.
9. Юшук Н.Д., Еремущкина Я.М. Основные принципы лечения острых кишечных инфекций. *Мед. помощь.* 2005; 1:16–19.

References

1. Bol'shakov I.N. [Chitosan enterosorption in case of acute uremic syndrome]. *Sovremennye Naukoemkie Tekhnologii.* 2004; 3:43–6.
2. Zhogolev K.D., Nikitin V.Yu., Tsygan V.N. [Chitin- and chitosan-based preparations in medicine and rational nutrition]. *Med. Immunol.* 2001; 2:316–7.
3. Zimon A.D., Leshchinko A.F. [Colloid Chemistry]. М.: Агар, 2001. 317 p.
4. Mazankova L.N., Pavlova A.A. [Development of nosotropic therapy for treatment of acute enteric infections in children]. *Detskie Infektsii.* 2006; 4:67–9.
5. Nikolaev V.G., Mikhailovsky S.V., Nikolaeva V.V., Oleshchuk A.M., Lisnichuk N.E. [Enterosorption: current state of the issue and future prospects]. *Vestnik Probl. Biol. i Meditsiny.* 2007; 4:7–17.
6. Onishchenko G.G., Kutyrev V.V., Shchukovskaya T.N., Smirnova N.I., Nikiforov A.K., Eremin S.A., Toporkov V.P. [Cholera specific prophylaxis in modern conditions]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2011; 1(107):5–13.
7. Skryabin K.G., Vikhoreva G.A., Varlamov V.P., editors [Chitin and Chitosan: Manufacturing, properties and application]. М.: Наука; 2002. 368 p.
8. Khotimchenko Yu.S., Kropotov A.V. [Application of enterosorbents in medicine]. *Tikhookeansky Med. Zh.* 1999; 2:84–9.
9. Yushchuk N.D., Eremushkina Ya.M. [Basic principles of acute enteric infection management]. *Med. Pomoshch'.* 2005; 1:16–19.

Authors:

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

Об авторах:

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

Поступила 21.11.14.