

М.В.Овчинникова¹, М.Н.Исляева¹, В.Г.Николаев², К.И.Бардахивская², А.К.Никифоров¹

ОЦЕНКА ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ СПЕЦИФИЧЕСКОГО ПРОТИВОХОЛЕРНОГО ЭНТЕРОСОРБЕНТА

¹ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов, Российская Федерация; ²Институт экспериментальной патологии, онкологии и радиобиологии им. Р.Е.Кавецкого НАН Украины, Киев, Украина

Проведено сравнительное изучение адсорбционной активности сконструированного специфического энтеросорбента в отношении фармакологических маркеров – метиленовой сини, бычьего сывороточного альбумина, желатина и нейтрализующей активности *in vivo* в отношении специфического маркера – холерного токсина. Полученные данные свидетельствуют о том, что уровень сорбционной активности в отношении используемых маркерных веществ как исходных микрочастиц хитозана, так и его специфического модификанта сопоставим с аналогичными показателями препаратов сравнения. Установлено, что процесс иммобилизации иммуноглобулинового компонента инициирует изменения электрохимических свойств активной поверхности хитозана, приводящие, с одной стороны, к снижению сорбционной активности специфического препарата по отношению к метиленовой сини и желатину, с другой, к повышению активности сорбции белкового маркера – бычьего сывороточного альбумина, по сравнению с исходной хитозановой матрицей. При определении токсиннейтрализующей способности экспериментального препарата выявлена его высокая антитоксическая активность в отношении энтеротоксина холерного вибриона. Полученные результаты дают основание рассматривать сконструированный антиэнтеротоксический энтеросорбент как вероятный прототип эффективного средства для профилактики и лечения холеры.

Ключевые слова: энтеросорбенты, специфические энтеросорбенты, хитозан, функциональная активность, фармакологические маркеры, холерный токсин, специфическая сорбция.

M.V.Ovchinnikova¹, M.N.Islyayeva¹, V.G.Nikolaev², K.I.Bardakhivskaya², A.K.Nikiforov¹

Evaluation of the Functional Activity of the Specific Anticholeraic Enterosorbent

¹Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov, Russian Federation; ²R.E.Kavetsky Institute of Experimental Pathology, Oncology, and Radiobiology, Kiev, Ukraine

Carried out is comparative analysis of adsorption activity of the constructed specific enterosorbent as regards pharmacological markers – methylene blue, bovine serum albumin, gelatin, and neutralizing activity *in vivo* with reference to the specific marker – cholera toxin. The data obtained testify to the fact that the level of the sorption activity in relation to the utilized marker substances both of initial micro-particles of chitosan, and its specific modification, is comparable to the corresponding parameter of the reference drugs. It is established that the process of immunoglobulin component immobilization initiates the changes in electro-chemical properties of the chitosan active surface, leading, on the one side, to the decrease in the sorption activity of the specific preparation in relation to methylene blue and gelatin, and on the other, to the increase in the protein marker sorption activity – bovine serum albumin, as compared to the initial chitosan matrix. In the course of the toxin-neutralizing capacity investigation, identified has been high anti-toxic activity of the experimental preparation in reference to cholera vibrio enterotoxin. The results attained give grounds to view the constructed anti-enterotoxic enterosorbent as potential prototype of efficient aids for cholera prophylaxis and treatment.

Key words: enterosorbents, specific enterosorbents, chitosan, functional activity, pharmacological markers, cholera toxin, specific sorption.

Острые кишечные инфекции (ОКИ) характеризуются отсутствием сезонности и возрастной избирательности заболеваемости, развитием нестойкого, кратковременного видоспецифического иммунитета, что предполагает возможность повторного развития инфекционного процесса через ограниченный промежуток времени [7]. Отсутствие тенденции к снижению уровня заболеваемости, утяжеление клинического течения отдельных нозологических форм, развитие резистентности возбудителей к традиционно применяемым этиотропным препаратам обуславливают актуальность разработки новых препаратов для этиопатогенетической терапии и профилактики ОКИ, в том числе и холеры.

Известно, что в патогенезе ряда инфекционных заболеваний большое значение имеют степень специ-

фической и неспецифической интоксикации, состояние систем иммунитета и естественной детоксикации организма, а при кишечных инфекциях – нарушения структуры и функции желудочно-кишечного тракта под действием различных бактериальных или вирусных возбудителей [9]. При этом современные методы лечения, направленные на нейтрализацию действия токсинов, зачастую оказываются малоэффективными. Разработка новых методов лечения больных острыми кишечными инфекционными заболеваниями тесно связана с внедрением в клиническую практику энтеросорбции. Энтеросорбция является составной частью эфферентной терапии, конечной целью которой является прекращение действия токсинов различного происхождения и их элиминация из организма [3, 8]. Лечебный эффект энтеросорбентов осуществляется в

результате их прямого и опосредованного действия на патогенетические механизмы. Вследствие этого эффективная терапия при инфекционных кишечных заболеваниях является вполне обоснованной [3].

В настоящее время активно развивается направление, связанное с разработкой селективных энтеросорбентов путем регулирования размеров пор сорбционных материалов, химического модифицирования поверхности, а также придание избирательности иммобилизацией на сорбентах специфических лигандов и рецепторов [4]. Последнее особенно актуально при разработке энтеросорбентов с прогнозируемыми свойствами, в том числе избирательной антитоксической направленности.

Относительной количественной характеристикой функциональной активности энтеросорбентов является адсорбционная способность, определяемая по веществам-маркерам [3, 10]. При разработке и стандартизации новых видов энтеросорбционных препаратов требованиями нормативно-технической документации предусмотрено использование не менее двух общепринятых веществ-маркеров для оценки данной характеристики. С целью получения прогностической информации в отношении специфической адсорбционной активности вводятся тесты с конкретными патологическими агентами [10]. В качестве веществ-маркеров, как правило, используют метиленовую синь, имитирующую низко- и среднемолекулярные токсиканты, альбумины и желатин – для оценки белок-связывающей активности, обуславливающей детоксикационную сорбцию патологических агентов белковой природы [6]. При изучении специфических свойств энтеросорбентов применяют различные экзо-, эндотоксические и микробиологические маркеры, тест-металлы [10, 11].

Для разработки прототипа противохолерного препарата направленного антитоксического действия нами был сконструирован энтеросорбент, представляющий собой микрочастицы высокомолекулярного хитозана с иммобилизованными антиэнтеротоксическими иммуноглобулинами [1]. Такой специфический модификант должен сохранять способность к неспецифической сорбции, характерную для исходных микрочастиц хитозана, а также проявлять специфическую активность в отношении холерного токсина.

Целью данного исследования являлось изучение адсорбционной способности экспериментального энтеросорбента и микрочастиц хитозана в отношении стандартных фармакологических маркеров в тестах *in vitro* и их антитоксической активности в отношении энтеротоксина холерного вибриона в опыте *in vivo*.

Материалы и методы

В работу взяты 3 серии экспериментального специфического противохолерного энтеросорбента и 3 серии хитозана пищевого высокомолекулярного (ЗАО «Биопрогресс», Россия), растворенного в 2,5 % растворе лимонной кислоты и использованного в

качестве сорбционной матрицы-носителя. В качестве препарата сравнения в углеволокнистом варианте использовали Карболайн – энтеросорбент IV поколения, разработанный в 90-х годах в институте экспериментальной патологии, онкологии и радиобиологии им. Р.Е.Кавецкого НАН Украины. Данный энтеросорбент проявляет высокую сорбционную активность в отношении различных патогенов и продуктов их метаболизма, в том числе холерного вибриона. Карболайн (первоначально Белосорб) – это единственный энтеросорбент, который был успешно применен для лечения холеры в Украине при вспышке заболевания в 1995 г.

В качестве веществ-маркеров для определения адсорбционной способности энтеросорбентов применяли растворы метиленового синего (МС), бычьего сывороточного альбумина (БСА) и желатина в концентрации 0,15, 0,5 и 0,6 % соответственно.

Определение неспецифической адсорбционной способности энтеросорбентов в отношении метиленового синего проводили по методике, изложенной в ФС 42-3246-95 «Таблетки угля активированного». Для этого к навеске энтеросорбента добавляли 0,15 % раствор метиленового синего. Взаимодействие сорбат-сорбент осуществлялось на лабораторном шейкере при средней скорости 150 колебательных движений в минуту. Равновесные растворы отделяли фильтрацией через мембраны с размером пор 0,45 мкм с последующим определением их оптической плотности на спектрофотометре в максимуме поглощения 664 нм в сравнении с оптической плотностью исходного раствора (раствор сравнения) метиленового синего. Адсорбционную способность вычисляли по формуле:

$$X = (D_0 - D) \cdot a \cdot 50/D_0 \cdot m \cdot (1 - 0,01 \cdot W),$$

где D_0 – оптическая плотность раствора сравнения МС; D – оптическая плотность испытуемого раствора; m – навеска препарата, г; a – фактическое содержание МС в растворе сравнения, мг/мл; W – влажность образца, %; 50 – объем раствора МС, мл.

Белок-связывающую активность изучали по методике ВФС 42-2148-92 «Полисорб» в модификации В.И.Решетникова (2005): к навескам энтеросорбентов добавляли 0,5 % раствор бычьего сывороточного альбумина и помещали на лабораторный шейкер. После экспозиции проводили осаждение коллоидных взвесей центрифугированием и осуществляли аналитическую детекцию непрореагировавшего БСА на спектрофотометре в максимуме поглощения 280 нм. В качестве раствора сравнения использовали исходный раствор БСА. Адсорбционную способность энтеросорбентов вычисляли по формуле:

$$X = (D_0 - D) \cdot a \cdot 25/D_0 \cdot b \cdot (1 - 0,01 \cdot W),$$

где D_0 – оптическая плотность раствора сравнения БСА; D – оптическая плотность испытуемого

раствора; m – навеска препарата, г; b – фактическое содержание БСА в растворе сравнения, мг/мл; W – влажность образца, %; 25 – объем раствора сравнения БСА, мл.

Адсорбционную активность по желатину определяли по методике ФС 42-3731-99 «Полисорб» в модификации В.И.Решетникова (2005). Навески сорбентов помещали в раствор сорбата и оставляли на лабораторном шейкере на 1 ч. Затем смеси центрифугировали. Определение непрореагировавшего белка в растворе желатина проводили в биуретовой реакции с построением калибровочного графика, учетом усредненных данных экстинкций трех повторностей колориметрирования стандартного раствора, в роли которого выступал 1 % раствор БСА.

Для изучения антитоксической активности применяли препарат очищенного холерного токсина с концентрацией белка 160 мкг/мл и удельной активностью $8,2 \cdot 10^2$ ЕД₅₀/мл. Определение величины ЕД₅₀ для холерного токсина проводили в опыте на белых мышах по отекогенному эффекту. Расчет величины ЕД₅₀ осуществляли по методу Кербера-Ашмарина [2].

В качестве биомodelей использовали беспородных белых мышей массой 18–20 г. Животных разделили на 5 экспериментальных групп по 8 шт. в каждой, отличающихся по характеру вводимого препарата: 1 группа – специфический энтеросорбент, 2 – микрочастицы хитозана, 3 – антитоксические иммуноглобулины, 4 – Карболайн, 5 – контроль (холерный токсин).

Определение антитоксической активности энтеросорбентов проводили следующим образом: навески сорбентов вносили в пробирки с раствором холерного токсина заданной концентрации, перемешивали и инкубировали при температуре 37 °С в течение 1 ч. После центрифугирования надосадочную жидкость отбирали, из полученных проб делали ряд последовательных разведений шагом 5 и вводили в объеме 50 мкл в подошвенную поверхность одной задней конечности. В противоположную конечность вводили такое же количество 0,9 % раствора натрия хлорида (контроль). Через 48 ч проводили эвтаназию животных и ампутировали опытную и контрольную лапы по коленному суставу. Ампутированные конечности взвешивали на электронных весах. Разница в

массе более 65 мг свидетельствовала о наличии токсина в пробе.

По результатам титрования на животных рассчитывали показатели относительной токсичности проб (по сравнению с контролем) по формуле:

$$OT = C_o / C_k \cdot 100 \%,$$

где OT – относительная токсичность; C_o – концентрация токсина (титр) в опытной пробе; C_k – концентрация токсина (титр) в контроле.

Результаты и обсуждение

Полученные данные свидетельствуют (табл. 1), что для специфического энтеросорбента, изготовленного на основе хитозановой матрицы, как и для самой хитозановой матрицы, характерны высокие показатели адсорбционной способности по фармакологическим веществам-маркерам, сопоставимые с показателями таких медицинских энтеросорбционных препаратов как Полисорб и микрокристаллическая целлюлоза (МКЦ) с 11 % пектина [10]. При этом наблюдалось снижение сорбционной активности специфического модификанта при взаимодействии с метиленовой синью на 26 %, желатином – на 61 % по сравнению с хитозановой матрицей за счет иммобилизации иммуноглобулинового лиганда. Следует отметить, что по данным исследований В.И.Решетникова [10] и И.А.Самылиной и соавт. [11], метиленовая синь активнее сорбируется энтеросорбентами с низкой влажностью, а белки – более увлажненными. Подобная зависимость, характерная для различных групп энтеросорбентов, выявлена и при изучении сконструированного препарата и активированной хитозановой матрицы. Сорбционная активность противохолерного энтеросорбента в отношении БСА повышалась на 5 % за счет изменения электрохимических свойств активных поверхностей хитозана и образования дополнительных адсорбционных центров энтеросорбента для белкового маркера.

Для активированных углей существует другая зависимость, что подтверждено нами при исследовании функциональной активности Карболайна. При

Таблица 1

Адсорбционная способность энтеросорбентов по веществам-маркерам

Объект	Влажность, %	Адсорбционная способность, мг/г		
		По альбумину	По желатину	По метиленовой сини
Специфический энтеросорбент	1,23	432,4±5,3	56,0±5,3	149,71±8,5
Хитозан	0,9	410,5±7,8	141,5±7,2	200,36±6,2
Полисорб*	2,3	372,5±7,3	328,2±3,3	47,7±2,9
МКЦ+11 % пектин*	6,0	402,7±6	99,2±10,7	107±9
Карболайн	56,1	44±3,1	46,5±6,3	557,8±4,3
ОУ-А*	6,9	61,6±9,7	46,7±1,2	255,2±9,8
Карбосорб*	28,6	20,4±1,6	40,5±1,3	243,6±6,8

* Литературные данные.

определении неспецифической сорбционной активности данного энтеросорбента, гранулы которого характеризуются высокой влажностью (до 60 %), установлено, что из всех представленных для сравнения энтеросорбентов он обладает наивысшей сорбционной активностью в отношении низко- и среднемолекулярных веществ и самой низкой активностью в отношении высокомолекулярных сорбатов (белков). Это характерно для всех углеродных энтеросорбентов, применяемых в практике здравоохранения [5].

Результаты определения токсиннейтрализующей активности, представленные в табл. 2, свидетельствуют, что экспериментальный специфический препарат обладает высокой антитоксической активностью сопоставимой с Карболайном, что отражает величина коэффициента инактивации (КИ) – 8,8 и 8,3 соответственно, обеспечивая значительное снижение показателя относительной токсичности (ОТ) препарата холерного токсина, введенного экспериментальным животным.

Таким образом, в результате проведенных исследований установлены величины функциональной активности экспериментального антитоксического энтеросорбента, исходных микрочастиц хитозана по основным веществам-маркерам. Показано, что сконструированный энтеросорбент проявляет высокую специфическую активность в отношении холерного токсина, при этом хитозановая матрица сохраняет свои неспецифические сорбционные свойства после иммобилизации белкового лиганда.

Результаты исследований дают основание предполагать, что сконструированный антиэнтеротоксический энтеросорбент может рассматриваться как прототип современного эффективного средства для профилактики и лечения холеры.

Авторы подтверждают отсутствие конфликта финансовых/нефинансовых интересов, связанных с написанием статьи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Аленина Т.В., Овчинникова М.В., Киреев М.Н., Никифоров А.К. Перспективные сорбционные матрицы для конструирования антитоксического холерного энтеросорбента. *Пробл. особо опасных инф.* 2013; 2:66–9.
2. Ашмарин И.П., Воробьев А.А., Статистические методы в микробиологических исследованиях. Л.: Медгиз, 1962. 58 с.
3. Беляков Н.А., Соломенников А.В. Энтеросорбция – механизм лечебного действия. *Эфферентная терапия.* 1997; 3(2):22–6.
4. Бородин Ю.И., Рачковская Л.Н. Энтеросорбция и энтеросорбенты. *Консилиум.* 2000; 3(13):11–3.
5. Гаврилов А.С., Гусельникова Е.В., Петров А.Ю. Технология получения таблеток угля активированного. *Химико-фармацевтический журн.* 2004; 38(1):58–60.
6. Исмаилов М.Г., Махкамов Х.М., Исмаилов П.Л. Высокоэффективный углеродный сорбент медицинского назначения из хлопкового лигнина. *Химико-фармацевтический журн.* 2000; 12(34):38–40.
7. Онищенко Г.Г. Актуальные проблемы профилактики инфекционных болезней на современном этапе. *Журн. микробиол.,*

Таблица 2

Показатели антитоксической активности энтеросорбентов

Исследуемый препарат	Показатели антитоксической активности	
	ОТ*, %	КИ**
Специфический энтеросорбент	11,2±2,1	8,8±1,0
Хитозан	85,6±3,3	2,1±0,11
Антитоксические иммуноглобулины	15,3±4,0	6,6±1,0
Карболайн	12,6±2,3	8,3±1,0
Контроль	98±2,5	1,02±1,5

*ОТ – относительная токсичность;

**КИ – коэффициент инактивации токсина (1/ОТ).

эпидемиол. и иммунобиол. 2010; 4:13–23.

8. Пермитина М.И., Попилов А.Н., Ратникова Л.И. Эффективность энтеросорбентов при острых кишечных инфекциях. *Врач.* 2007; 7:22–5.

9. Покровский В.И., Пак С.Г., Брико Н.И., Данилкин Б.К. Инфекционные болезни и эпидемиология. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2007. С. 264–77.

10. Решетников В.И. Оценка адсорбционной способности энтеросорбентов и их лекарственных форм. *Химико-фармацевтический журн.* 2003; 37(5):28–32.

11. Самылина И.А., Баландина И.А. Пути использования растительного сырья и его стандартизация. *Фармация.* 2004; 2:39–41.

References

1. Alenina T.V., Ovchinnikova M.V., Kireev M.N., Nikiforov A.K. [Prospective sorption matrices for antitoxic cholera enterosorbent constructing]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2013; 2:66–9.
2. Ashmarin I.P., Vorob'ev A.A. [Statistical Methods in Microbiological Investigations]. L.: Medgiz, 1962. 58 p.
3. Belyakov N.A., Solomennikov A.V. [Enterosorption – the mechanism of curative action]. *Efferentnaya Terapiya.* 1997; 3(2):22–6.
4. Boroдин Yu.I., Rachkovskaya L.N. [Enterosorption and enterosorbents]. *Konsilium.* 2000; 3(13):11–3.
5. Gavrilov A.S., Gusel'nikova E.V., Petrov A.Yu. [Method for the production of the activated carbon pills]. *Khimiko-Farmatsevt. Zh.* 2004; 38(1):58–60.
6. Ismailov M.G., Makhkamov Kh.M., Ismailov P.L. [Highly efficient carbon sorbent for medical use, made of cotton lignin]. *Khimiko-Farmatsevt. Zh.* 2000; 12(34):38–40.
7. Onishchenko G.G. [Current issues of infectious disease prophylaxis in the modern period]. *Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol.* 2010; 4:13–23.
8. Permitina M.I., Popilov A.N., Ratnikova L.I. [Effectiveness of enterosorbents in case of acute diarrheal diseases]. *Vrach.* 2007; 7:22–5.
9. Pokrovsky V.I., Pak S.G., Briko N.I., Danilkin B.K. [Infectious Diseases and Epidemiology]. M.: GEOTAR-Media; 2007. P. 264–77.
10. Reshetnikov V.I. [Assessment of the adsorption capacity of enterosorbents and their pharmaceutical forms]. *Khimiko-Farmatsevt. Zh.* 2003; 37(5):28–32.
11. Samylyna I.A., Balandina I.A. [Approaches to the usage of plant raw material and its standardization]. *Farmatsiya.* 2004; 2:39–41.

Authors:

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

Nikolaev V.G., Bardakhivskaya K.I. R.E.Kavetsky Institute of Experimental Pathology, Oncology, and Radiobiology. Kiev, Ukraine.

Об авторах:

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

Николаев В.Г., Бардахивская К.И. Институт экспериментальной патологии, онкологии и радиобиологии им. Р.Е.Кавецкого НАН Украины. Украина, Киев.

Поступила 16.06.14.