

бливо яскраво проявляється зменшенням вмісту найбільш нейротоксичних продуктів ОМБ - карбоксифенілгідрозонів.

Ключові слова: авеол, окисна модифікація білку, антистрессова активність.

УДК 616.22:616.127-005.4:612.084

ВЛИЯНИЕ АВЕОЛА НА ОКИСЛИТЕЛЬНУЮ МОДИФИКАЦИЮ БЕЛКА В КОРЕ ГОЛОВНОГО МОЗГА КРЫС ПРИ ОСТРОМ ИММОБИЛИЗАЦИОННОМ СТРЕССЕ

Войтенко А.Г.

Резюме. В экспериментах на крысах исследовано влияние нового отечественного фитопрепарата авеол на окислительную модификацию белка в коре головного мозга в сравнении с референтным препаратом настойкой женьшеня в условиях острого иммобилизационного стресса. Установлено, что авеол и настойка женьшеня значительно снижают накопление в коре головного мозга животных продуктов ОМБ – АФГ и КФГ. При этом авеол проявляет более выраженные нейропротекторные свойства, что особенно ярко проявляется уменьшением содержания наиболее нейротоксичных продуктов ОМБ - карбоксифенілгідрозонів.

Ключевые слова: авеол, окислительная модификация белка, антистрессовая активность.

UDC 616.22:616.127-005.4:612.084

The ACTION of AVEOL on OXIDATIVE MODIFICATION of PROTEIN in RAT BRAIN CORTEX under ACUTE STRESS INFLUENCES

Voitenko A.G.

Summary. The action of a new domestic plant drug aveol on oxidative modification of protein in rat brain cortex under acute stress influences in comparison with referent drug (Tinctura Ginsengi) was studied in rats. It was established the aveol and Tinctura Ginsengi have the similar influence on oxidative modification of protein in rat brain cortex under acute stress influences. The aveol has more strong activity than Tinctura Ginsengi.

Key words: aveol, oxidative modification of protein, antistress activity.

Стаття надійшла 17.01.2011 р.

УДК 615.832.9:579.64

И. П. Высеканцев^{1,2}, О. М. Бабинец¹, В. Ф. Марценюк¹, Л. Е. Шатилова¹

СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ АДСОРБЦИИ СТАНДАРТНЫХ МАРКЕРОВ И ПРОБИОТИКОВ SACCHAROMYCES BOULARDII И BIFIDOBACTERIUM BIFIDUM НА ЭНТЕРОСОРБЕНТАХ

¹Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины (г. Харьков)

²Медицинский факультет Харьковского национального университета им. В. Н. Каразина (г. Харьков)

Представленное исследование является фрагментом научно-исследовательской работы ИПК и К НАН Украины 2.2.6.54 «Исследование механизмов криоповреждений и криозащиты иммобилизованных клеток с целью повышения их сохранности при криоконсервировании и лиофилизации», номер госрегистрации 0110U000404.

Вступление. В медицинской практике для лечения больных с интоксикацией различной природы широкое распространение приобретают технологии сорбционной терапии, в частности энтеросорбция [1,3]. Показана эффективность энтеросорбции при кишечных инфекциях, вызванных патогенными и условно-патогенными микро-

организмами [8, 12], при тяжелых экзогенных отравлениях, термохимических и термомеханических поражениях [4,5,8], при постлучевой нейротоксической полипатии [2], при эндогенной интоксикации метаболического и микробного происхождения [4], при сорбционной модификации диеты [13] и в ряде других случаев.

По химической природе энтеросорбенты условно разделяют на пять групп [3]:

- углеродные энтеросорбенты;
- энтеросорбенты на основе природных и синтетических смол, синтетических полимеров и неперивариваемых липидов;
- кремнийсодержащие энтеросорбенты;

- энтеросорбенты на основе пищевых волокон, лигнина, хитина, пектинов, альгинатов;
- комбинированные энтеросорбенты, в состав которых входят комбинации препаратов из вышеуказанных групп.

Количественной характеристикой функциональной активности сорбентов является адсорбционная способность (АС) [10]. В силу различий физико-химических свойств разных групп энтеросорбентов и фармакопейных препаратов внутри каждой группы они обладают различной АС к разным по химическому строению и молекулярной массе токсинам, метаболитам, тяжелым металлам, микробным клеткам [3]. На фармацевтическом рынке предлагается достаточно большое количество лекарственных форм энтеросорбентов и в связи с этим представляет интерес сравнительное изучение АС этих препаратов по отношению к различным маркерам, предусмотренным фармакопейными статьями.

Энтеросорбенты привлекли наше внимание в связи с еще одной проблемой. В настоящее время специалистами разных медицинских направлений и биотехнологами проводятся исследования по созданию иммобилизованных клеточных препаратов. Такие препараты будет более легко и целенаправленно транспортировать в пораженные органы и ткани. Они будут более устойчивыми к воздействию внутренних физико-химических факторов макроорганизма. Ожидается более выраженный терапевтический эффект от применения иммобилизованных препаратов за счет синергического и пролонгирующего действия материала носителя.

При ряде заболеваний и под воздействием различных экзогенных факторов у человека часто развивается дисбиоз кишечника [1]. В комплексной терапии этого синдрома используют энтеросорбенты, про- и пребиотики, синбиотики [1, 3, 9].

Существуют единичные сообщения о первом опыте разработки препаратов пробиотиков, иммобилизованных на энтеросорбентах [6, 7, 8]. Технологии иммобилизации пробиотиков на энтеросорбентах в полном объеме не разработаны. Терапевтический эффект иммобилизованных на энтеросорбентах пробиотиков также исследован мало.

Целью представленного исследования было сравнительное изучение АС различных коммерческих форм энтеросорбентов и экспериментальное обоснование условий адсорбции клеток пробиотиков на энтеросорбентах, выбранных в качестве носителей.

Объекты и методы исследований. Исследования проводили со следующими энтеросорбентами: уголь активированный (АО «Стома», Украина), Сорбекс (гранулированный активированный уголь, АО «Экосорб», Украина), СУМС-1 (на основе окиси алюминия с покрытием из углеродной пленки, ОАО «Новосибхимфарм», РФ), Лиферан (на основе лигнина и целлюлозы, ООО «Экоферн»,

РФ), Атоксил (на основе двуокиси кремния, ООО «Орисил-Фарм», РФ), Лактофилтрум (на основе лигнина и лактулозы, АО «Лексиръ», РФ), Мультисорб (на основе целлюлозы, гемицеллюлозы, пектина, лигнина, ООО «НПП» «Ариадна», Украина).

АС энтеросорбентов определяли по фармакопейным методикам в модификациях В. И. Решетникова [11]. В качестве маркеров использовали метиленовый синий («Макрохим», РФ), имитирующий среднемолекулярные токсины, и человеческий сывороточный альбумин (Бакстер, АГ, Швейцария), применяемый для оценки белоксвязывающей активности сорбентов [10].

При изучении динамики сорбции метиленового синего в колбу со 125 мл стандартного раствора красителя (ГОСТ 4453-74) добавляли 625 мг энтеросорбентов. Активированный уголь предварительно измельчали, а Сорбекс извлекали из капсул. Колбу помещали на качалку (140 оборотов платформы в минуту), через каждые 5 минут отбирали пробы, центрифугировали их 2 минуты при 2000g и определяли оптическую плотность надосадочной жидкости на ФЭК-56 (объем кюветы 1,0 см³, фильтр №6, длина волны 320 нм).

В опытах по изучению адсорбции микробных клеток на энтеросорбентах использовали промышленные штаммы пробиотиков *Saccharomyces boulardii* и *Bifidobacterium bifidum*. 2-суточные культуры микроорганизмов, выращенные на скопленных агаризированных средах, смывали физиологическим раствором. Исходная концентрация микроорганизмов составляла (2-5)×10⁷ клеток/мл. В 200 мл клеточной суспензии, помещенной в колбу объемом 500 мл, вносили 1 г сорбента. Колбу помещали на качалку. Каждые 10 минут отбирали по 5 мл суспензии, отстаивали ее 1 мин в преципитационной пробирке. Затем из верхней части образцов отбирали по 10 мкл суспензии и определяли количество неадсорбированных клеток путем их подсчета в камере Горяева. Адсорбцию микробных клеток изучали при двух температурных режимах – при комнатной температуре и при 0÷2°C.

Белоксвязывающую активность энтеросорбентов определяли в полном соответствии с унифицированной методикой, предложенной в [10]. В качестве маркера использовали человеческий сывороточный альбумин.

Статистическую обработку полученных результатов проводили по общепринятым в биологических исследованиях методам [9] с использованием пакета программ SPSS 11.0. Достоверность результатов составляла 95%.

Результаты исследований и их обсуждение. При изучении способности энтеросорбентов к сорбции метиленового синего было установлено, что все сорбенты, за исключением Атоксила, сорбируют этот маркер.

Активированный уголь и Сорбекс полностью сорбировали краситель, соответственно через 15 и 40 мин (рис. 1). Лиферан через 40 минут сорби-

ровал 56,7% красителя, а через 80 минут – 83,4%. СУМС-1 через 30 минут сорбировал 16,7% красителя. Лактофильтрум через 20 минут сорбировал 87,5% красителя. Мультисорб через 10 минут сорбировал 76,2% красителя. Десорбция метиленового синего до 80-ой минуты (время наблюдения) во всех вариантах опыта не происходила.

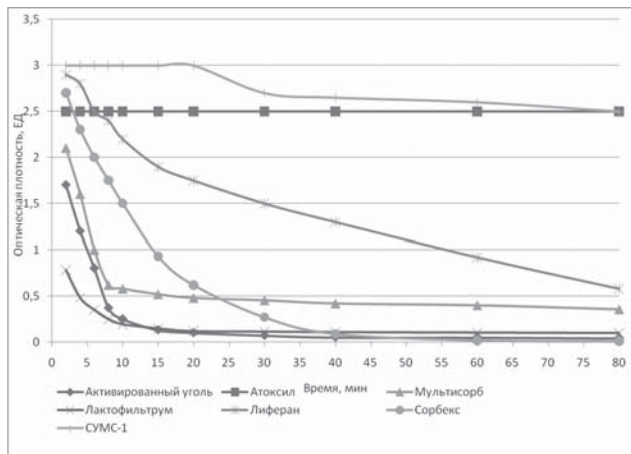


Рис. 1. Динамика сорбции метиленового синего исследуемыми сорбентами.
Примечание: с 5 минуты сорбции все различия достоверны ($p \leq 0,05$).

Атоксил в течение 80 минут (время наблюдения) метиленовый синий не сорбировал, что согласуется с литературными данными о преимущественно белоксвязывающей активности двуокиси кремния [8, 10].

Наиболее высокая АС по отношению к человеческому сывороточному белку была у Атоксила и Мультисорба (табл.). У всех остальных энтеросорбентов этот показатель был в несколько раз ниже.

Таблица
Адсорбционная способность энтеросорбентов по отношению к альбумину

Энтеросорбенты	Влажность, %	АС, мг/г
		$\chi \pm S \chi$
Активированный уголь	6,4	54,1±7,5
Лиферан	6,0	56,4±2,8
Сорбекс	5,9	61,8±8,4
СУМС-1	4,6	23,8±2,9
Атоксил	5,0	248±7,2
Лактофильтрум	8,9	41,4±3,9
Мультисорб	17,2	198±6,4

В экспериментах по адсорбции дрожжей *S. boulardii* при комнатной температуре (16-18°C) максимальное количество клеток, адсорбированных на 1 г СУМС-1, Активированном угле, Сорбексе, Лиферане, Атоксиле, Лактофильтруме,

Мультисорбе составляло соответственно $0,6 \times 10^7$, $0,9 \times 10^7$, $0,2 \times 10^7$, $1,3 \times 10^7$, $1,2 \times 10^7$, $0,5 \times 10^7$, $1,5 \times 10^7$ клеток (рис. 2). Время максимальной адсорбции дрожжевых клеток на изучавшихся сорбентах также было разным. Процесс десорбции клеток с СУМС-1, Активированном угле, Сорбексе, Лиферане, Атоксиле, Лактофильтруме, Мультисорбе начинался через 30, 100, 65, 100, 20, 30, 35 мин, соответственно.

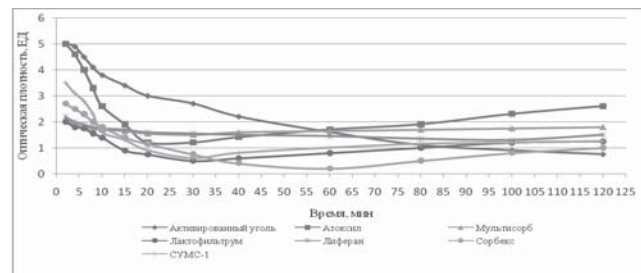


Рис. 2. Динамика сорбции клеток *S. boulardii* исследуемыми сорбентами при температуре 16-18°C.
Примечание: с 5 минуты сорбции все различия достоверны ($p \leq 0,05$).

При понижении температуры до $0 \pm 2^\circ \text{C}$ адсорбция клеток *S. boulardii* на энтеросорбентах была достоверно более выраженной (рис. 3). Максимальное количество клеток, адсорбированных на СУМС-1, активированном угле, Сорбексе, Лиферане, Мультисорбе составляло $0,4 \times 10^7$, $0,6 \times 10^7$, $0,2 \times 10^7$, $0,6 \times 10^7$, $0,8 \times 10^7$ клеток/мл соответственно. Количество клеток, адсорбированных на Атоксиле и Лактофильтруме, не изменялось. При этой температуре увеличилось время максимальной адсорбции клеток на большинстве сорбентов.

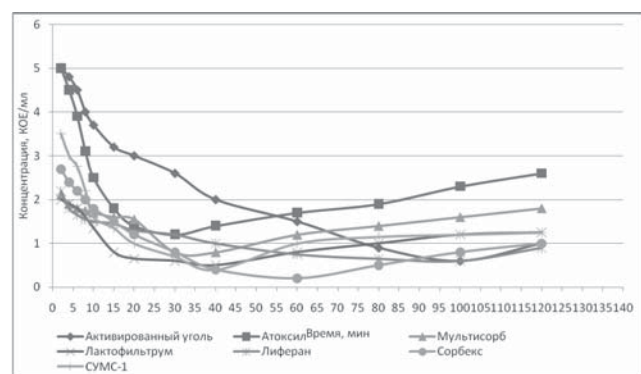


Рис. 3. Динамика сорбции клеток *S. boulardii* исследуемыми сорбентами при температуре $0 \pm 2^\circ \text{C}$.
Примечание: с 5 минуты сорбции все различия достоверны ($p \leq 0,05$).

В экспериментах по адсорбции *B. bifidum* были получены результаты, аналогичные данным экспериментов с *S. boulardii* (рис. 4, 5).

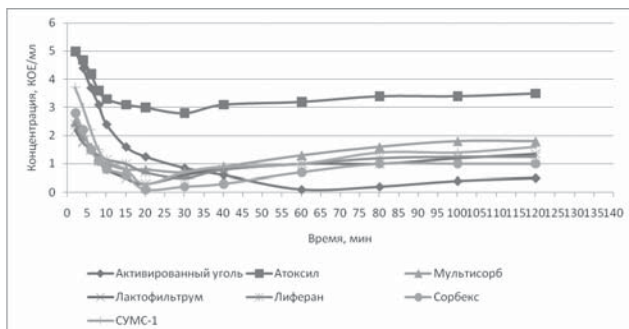


Рис. 4. Динамика сорбции клеток *V. bifidum* исследуемыми сорбентами при температуре 16 18°С. Примечание: с 5 минуты сорбции все различия достоверны ($p \leq 0,05$).

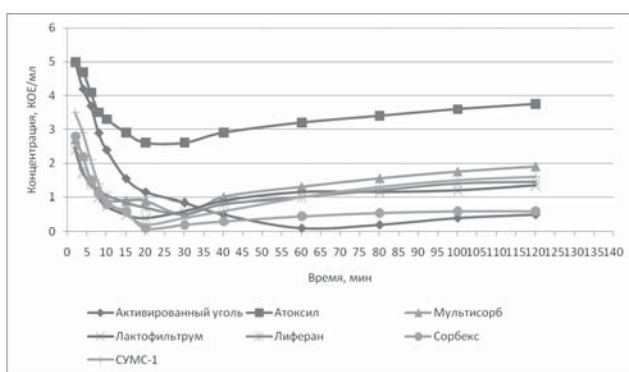


Рис. 5. Динамика сорбции клеток *V. bifidum* исследуемыми сорбентами при температуре 0 2°С. Примечание: с 5 минуты сорбции все различия достоверны ($p \leq 0,05$).

Анализ результатов, полученных в опытах с маркерами метиленовым синим и альбумином, показал наличие корреляционной зависимости сорбции метиленового синего от химической природы сорбента, что может быть обусловлено более выраженным молекулярным механизмом адсорбции у сорбентов на основе активированных углей. Атоксил, сорбент на основе двуокиси кремния, обладает в основном белоксвязывающей активностью. Природные органические сорбенты сочетают молекулярный и комплексобразующий механизмы сорбции, о чем свидетельствуют высокие показатели связывания обоих маркеров. Результаты оценки АС природных органических сорбентов по отношению к маркерам метиленовому синему и альбумину не коррелируют со способностью связывать микробные клетки, что наиболее вероятно обусловлено незначительным количеством на их поверхности молекул, обеспечивающих точечные адгезивные контакты.

В экспериментах по адсорбции *S. boulardii* показана зависимость этого процесса от температуры. Более высокие показатели числа адсорбированных клеток и увеличение времени адсорбции наблюдали при температуре 0,2°. Поскольку температурная зависимость АС была отмечена у сорбентов с преобладанием разных механизмов действия (адсорбция, абсорбция, ионный

обмен, комплексообразование) мы затрудняемся объяснить изменение каких физико-химических характеристик сорбентов лежит в основе этого явления.

Выводы.

1. Для оценки адсорбционной способности коммерческих препаратов энтеросорбентов необходимо использовать несколько маркеров, соответствующих токсинам различной природы и молекулярной массы. Показатели адсорбционной способности по стандартным маркерам не всегда коррелируют с показателями адсорбции микробных клеток.

2. Экспериментально определены условия для эффективной адсорбции пробиотиков *S. boulardii* и *V. bifidum* на энтеросорбентах СУМС-1, Активированном угле, Сорбексе, Атоксиле, Лактофилтруме: температура 0 2°; среднее время экспозиции 30-60 минут.

Перспективы дальнейших исследований. Дальнейшие исследования в этом направлении позволят создать основы для разработки технологий получения препаратов иммобилизованных пробиотиков. Носители могут проявлять пребиотические свойства, что улучшит терапевтические качества препаратов. Также предполагается более высокая устойчивость иммобилизованных пробиотиков к процессам криоконсервирования, лиофилизации или тепловой сушки, что будет использовано при изготовлении коммерческих форм препаратов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Дисбиоз кишечника. Руководство по диагностике и лечению. - 2-е изд., испр. и доп. / под ред. Е. И. Ткаченко, А. Н. Суворова. - СПб: ИнформМед. - 2009. - 276 с.
2. Захараш М. П. Успехи и перспективы сорбционной терапии постлучевой нейросоматической полипатии [Электронный ресурс] / Захараш М. П., Иванова Н. В., Масленый В. Н. и др. // Режим доступа <http://kiulong.com.ua/content/view/71/58/>
3. Николаев В. Г. Современные энтеросорбенты и механизмы их действия / В. Г. Николаев, С. В. Михайловский, Н. М. Гурина // Эфферентная терапия. — 2005. — № 4. — С. 3-17.
4. Осадчая О. И. Применение энтеросорбции у больных с эндогенной интоксикацией различной природы / О. И. Осадчая, Б. С. Шейман, А. М. Боярская [и др.] // Новости медицины и фармации в Украине. - 2008. - №17. - С. 10-11.
5. Осадчая О. И. Роль энтеросорбции в лечении метаболической интоксикации у больных с тяжелыми ожогами / О. И. Осадчая // Новости медицины и фармации в Украине. - 2009. - №1. - С.13.
6. РФ, патент 2164801 С1, МПК7 А61К35/74, А23С9/12, С12Н1/08, заявл. 1999.06.12., опубл. 2001.04.10. Молокеев А. В., Никулин Л. Г., Ильина Р. М., Криницкий Э. В., Карих Т. Л., Молокеева Н. В., Байбаков В. И., Андреева М. А., Соболева Н. В. «Препарат – пробиотик в сухой иммобилизованной форме».
7. РФ, патент 2118535 С1, МПК А61К35/74, С12Н11/14. Заявл. 1997. 03.20., опубл. 1998.09.10. Бородин Ю. И., Бурмистров В. А., Гуськов А. А., Рачковская Л. Н., Репина В. В., Репин В. Е., Саранина И. В. «Комплексный бактериальный препарат».
8. Применение лечебно-профилактических препаратов, изготовленных на основе кремнийорганических адсорбентов. Методические рекомендации / проф. Знамен-

- ский В. А., акад. Возианов А., Ф., к. м. н. Возианова Ж. М. и др. – Киев: Богдана – 2009. – 16 с.
9. Приседський Ю. Г. Статистична обробка результатів біологічних експериментів. Навч. посіб. – Донецьк: Донецьк. Держ. Університет. – 1999. – 210с.
10. Решетников В.И. Оценка адсорбционной способности энтеросорбентов и их лекарственных форм / В.И. Решетников // Химико-фармацевтический журнал. – 2003. – Т.37, №5. – С.28-32.
11. Слинякова И.Б., Денисова Т. И. Кремнийорганические адсорбенты. Получение, свойства, применение – Киев: Наук. думка, 1988. – 258 с.
12. Сухов Ю. А. Влияние энтеросорбции на уровень провоспалительных цитокинов при кишечных инфекциях и кори / Ю.А.Сухов, В.В.Гебеш, А.П. Голуб // Новости медицины и фармации в Украине. – 2009. - №11 – 12. – С. 10 – 11.
13. Adachi S. Preparation of peptide mixture with high Fisher ratio from protein hydrolysate by adsorption on activated carbon / S.Adachi, T.Yamanaka, S.Hayashi [et al.] // Bioseparation. – 1992. – Vol. 3, №4. – P. 227-232.

УДК 615.832.9:579.64

СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ АДсорбЦИИ СТАНДАРТНЫХ МАРКЕРОВ И ПРОБИОТИКОВ *SACCHAROMYCES BOULARDII* И *BIFIDOBACTERIUM BIFIDUM* НА ЭНТЕРОСОРБЕНТАХ

Высеканцев И. П., Бабинцев О. М., Марценюк В. Ф., Шатилова Л. Е.

Резюме. Изучали функциональную активность коммерческих препаратов сорбентов по отношению к стандартным маркерам метиленовому синему и человеческому сывороточному альбумину, а также их способность к адсорбции клеток микроорганизмов-пробиотиков. Показано, что у сорбентов на основе активированного угля более выражен молекулярный механизм адсорбции (маркер – метиленовый синий), у двуокиси кремния – белоксвязывающая активность (маркер – альбумин). Природные органические сорбенты совмещают молекулярный и комплексосвязывающий механизмы сорбции. Экспериментально определены условия для эффективной адсорбции пробиотиков на энтеросорбентах. Обсуждаются перспективы разработки препаратов иммобилизованных на энтеросорбентах пробиотиков.

Ключевые слова: энтеросорбенты, микроорганизмы, пробиотики, иммобилизованные клетки, маркеры.

УДК 615.832.9:579.64

ПОРІВНЯЛЬНЕ ВИВЧЕННЯ АДсорбЦІЇ СТАНДАРТНИХ МАРКЕРІВ І ПРОБИОТИКІВ *SACCHAROMYCES BOULARDII* І *BIFIDOBACTERIUM BIFIDUM* НА ЕНТЕРОСОРБЕНТАХ

Висеканцев І. П., Бабінець О. М., Марценюк В. П., Шатілова Л. Є.

Резюме. Вивчали функціональну активність комерційних препаратів сорбентів по відношенню до стандартних маркерів метиленового синього та сироваткового альбуміну людини, їх здатність до адсорбції клітинмікроорганізмів – пробиотиків. Показано, що у сорбентів на основі активованого вугілля більш виражений молекулярний механізм адсорбції (маркер – метиленовий синій), у двоокису кремнію – білокзв'язуюча активність (маркер – альбумін). Природні органічні сорбенти сполучають молекулярний і комплексоутворюючий механізми сорбції. Експериментально визначено умови для ефективної адсорбції пробиотиків на ентеросорбентах. Обговорюються перспективи розробки препаратів імобілізованих на ентеросорбентах пробиотиків.

Ключові слова: ентеросорбенти, мікроорганізми, пробиотики, імобілізовані клітини, маркери.

UDC 615.832.9:579.64

COMPARATIVE STUDY OF ADSORPTION OF STANDARD MARKERS AND *SACCHAROMYCES BOULARDII*, *BIFIDOBACTERIUM BIFIDUM* PROBIOTICS ON ENTEROSORBENTS

Vysekantsev I.P., Babinets O.M., Martsenyuk V.F., Shatilova L.E.

Summary. Functional activity of commercial preparations of absorbents relative to methylene blue and human serum albumin standard markers and also their capacity to cell absorption of microorganisms-probiotics were studied. It has been shown that in absorbents based on activated carbon the molecular mechanism of absorption (methylene blue marker) is more expressed, in silicon dioxide the protein-connecting activity is more done (albumin marker). Natural organic absorbents combine molecular and complex-connecting mechanisms of absorption. Conditions for effective absorption of probiotics on enterosorbents were experimentally determined. Development perspectives of preparations of immobilized on enterosorbents probiotics are discussed.

Key words: enterosorbents, microorganisms, probiotics, immobilized cells, markers.

Стаття надійшла 7.02.2011 р.