

УДК 619: 579.62. 57.083.13

В. В. УХОВСЬКИЙ, кандидат ветеринарних наук

Інститут ветеринарної медицини НААН, м. Київ

Ю.С. ГОЛУБ, кандидат ветеринарних наук

Національний університет біоресурсів і природокористування України

О. І. АЛБУЛОВ, доктор біол. наук, професор,

ВНІПТБ, РФ

ВИЗНАЧЕННЯ СОРБЦІЙНИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ ХІТОЗАНУ ПО ВІДНОШЕННЮ ДО ЛЕПТОСПІР

*В останні десятиріччя у світі спостерігається значний інтерес до природних біополімерів. Найбільш перспективними вважають хітин/хітозан, які привертають до себе увагу не тільки завдяки широкому комплексу фізико-хімічних і біологічних властивостей, а і практично необмеженою відтворюваністю сировинної бази. Проілюстровані дані щодо визначення сорбційних властивостей трьох дослідних серій водорозчинного хітозану по відношенню до вакцинного штаму лептоспір. Встановлено, що всі апробовані серії хітозану (в умовах *invitro*) у концентраціях 2,5% та 1,0% зв'язують лептоспіри в скупчення по 2-40 мікробних особин.*

Ключові слова: лептоспіра, вакцина, ад'ювант, природні біополімери, хітозан.

З метою одержання активного штучного імунітету використовують проти-лептоспірозну вакцину. Вакцина проти лептоспірозу для тварин являє собою суспензію одного чи більшої кількості сероварів патогенних лептоспір, інактивованих та концентрованих таким чином, щоб була збережена їх імуногенна активність.

На практиці при виготовленні промислових серій протилептоспірозних вакцин суспензію лептоспір концентрують шляхом з'єднання із 6% гелем гідроокису алюмінію (ГОА), який вносять в кінцевій концентрації 30% до об'єму вакцини з подальшим її відстоюванням [1]. ГОА при цьому виконує як депонуючу, так і ад'ювантну роль. Дослідження показують, що превентивна дія сироватки крові телят, що отримали однакову кількість антигенів лептоспір, суттєво різниться в залежності від вмісту ГОА. Оптимальне значення отримано при 30% концентрації ГОА, імунітет при цьому мав найбільшу напруженість та тривалість. До недоліків цього методу деякі автори відносять часткову модифікацію лептоспірозного антигену за рахунок зв'язування активними центрами молекули ГОА частини епітопів лептоспірозного антигену і відповідно часткову зміну імуногенних властивостей вакцини [2].

Дослідження в області полімерних носіїв антигену дали змогу з'ясувати природу таких модифікацій. Поєднання гідрофільного антигену та гідрофобної полімерної матриці веде до зниження ступеню інкапсуляції антигену на поверхні матриці (мікросфери), підвищеному вивільненню антигена. Гідрофобна матриця запобігає проникненню води до центру мікросфери, формуючи кисле мікрооточення, яке утворюється внаслідок скопичення кислих продуктів розпаду (таких як молочна та гліколева кислоти). Кисле мікрооточення в поєднанні з підвищеною температурою та гідрофобними поверхнями може призвести до створення таких

умов, в яких антиген, що має сприяти функції імуногенезу, зазвичай інактивується. Тому на зміну мікросферам гідрату окису алюмінію, полілактиду, полілактід – ко – гліколіду, що є гідрофобними матрицями для інкапсуляції антигену, приходять нові синтетичні форми, такі, як лівоізомерний полілактід-поліетиленгліколь (poly-DL-lactide-poly-ethylenglycol – PELA) [3].

Питання концентрування лептоспірного антигену та введення до складу протилептоспірних вакцин нових перспективних ад'ювантів вимагають свого вирішення. Вдосконалення направлені на збереження і підсилення антигенних та імуногенних властивостей, як самого антигену, так і в цілому готового біопрепарату.

В даному ракурсі перспективним є дослідження біополімеру «хітозан», який має унікальні біологічні характеристики, а саме: природне походження, виражену біологічну активність, нешкідливість, біосумісність, технологічність, хелатуючу спроможність, можливість повної природної біодеградації та цілий ряд інших властивостей [4,5].

Хітозан є продуктом деацетилювання хітину, який відноситься до числа найбільш поширених в природі органічних сполук. Хітин є структурним поліцукридом екзоскелету ракоподібних (краби, креветки, криль), він також знаходиться в кутикулі комах, клітинних стінках грибів та деяких бактерій.

В умовах сьогодення хітин використовується в різноманітних галузях. Особливої уваги заслуговує його використання у ветеринарній та гуманній медицині. Встановлено, що хітозан володіє низькою токсичністю і пірогенністю [6,7].

Хітозан здатен утворювати гелі в кислих розчинах (рН 5-6), плівку на шкірі та слизовій оболонці шлунково-кишкового тракту, володіє високою адсорбційною ємністю, здатен виводити токсичні речовини, стимулює клітинний та гуморальний імунітет [8]. Ці унікальні властивості хітозану можуть бути використані для створення засобів лікування та профілактики різних захворювань у сільськогосподарських тварин.

Ряд авторів зазначають, що підшкірне введення лабораторним тваринам (мишам) сукциноілу хітозану (молекулярная масса 210 кДа, СДА 75-92 %) в якості ад'юванту надає можливість отримувати імунну відповідь на введення БСА на рівні або й вище, ніж при використанні відомих масляних та мінеральних ад'ювантів [9,10].

Мета досліджень – визначення сорбційних властивостей трьох водорозчинних серій хітозану до вакцинного штаму лептоспір.

Матеріали та методи. У роботі використовувався вакцинний штам лептоспір ВГНКИ – 4 (серовар *tarassovi*, серогрупа *Tarassovi*, даний штам використовується для виготовлення більшості вакцин проти лептоспірозу, наприклад: вакцина проти лептоспірозу тварин полівалентна (варіант *suis*), вакцина полівалентна «ВГНКИ» проти лептоспірозу тварин).

Для забезпечення оптимального росту культур лептоспір готували середовище Кортгофа (рН 7,2-7,4) з додаванням 10% сироватки крові кролів. В досліді використовували 10-14 денну культуру штаму лептоспір з накопиченням не менше 70-80 рухомих з типовою морфологією лептоспір у полі зору мікроскопу.

Для проведення досліді використовувались три серії водорозчинного хітозану: а) хітозан №1 – «Хітозан пищевой (гидрохлорид)», мМ – 39 кДа, СД -79%; б) хітозан №2 – «Сукцинат хитозана (сублимационная сушка)», мМ – 330 кДа, СД -85%; в) хітозан №3 – «Сукцинат хитозана», мМ – 380 кДа, СД – 75%. Маточні

розчини трьох серій хітозану готували у флаконах по 100 мл: до 95 мл середовища Кортгофа додавали 5 г дослідних препаратів хітозану (концентрація 5%). Отриманий розчин стерилізували протягом 1 години, при 1 атмосфері та температурі 120 °С.

Для досліджень готували по 5 пробірок суміші культури лептоспир з маточними розчинами хітозану та отримували робочу суміш культури лептоспир з дослідними серіями препарату в концентрації: 2,5% (2,5 мл культури лептоспир + 2,5 мл маточного розчину хітозану концентрацією 5%); та відповідно 1,0%; 0,5%; 0,1% та 0,05%.

Пробірки залишали на 7 діб в термостаті при температурі 29°C. Проводили контроль росту культур лептоспир на середовищі без додавання досліджуваного препарату. Облік результатів дослідів проводили на третю та сьому добу культивування. Дослідження проводили у трьохкратній повторності.

Результати досліджень.

В результаті проведеної роботи із визначення сорбційних властивостей трьох серій водорозчинного хітозану по відношенню до вакцинного штаму лептоспир, встановлено, що апробовані серії хітозану (хітозан №1, хітозан №2, хітозан №3) в умовах *in vitro* у концентраціях 2,5% та 1,0% найліпше зв'язують лептоспири в скупчення по 3-40 мікробних особин, що становить 2 – 40% від загальної кількості лептоспир в полі зору мікроскопу, а отже і в зразку (таблиця 1).

Згідно даної методики визначення сорбційної активності розчинів водорозчинного хітозану по відношенню до патогенних лептоспир, на нашу думку, найкращі перспективи щодо використання в якості ад'юванту в складі вакцини проти лептоспірозу, з досліджених зразків хітозану, має хітозан № 2.

Таблиця 1

Ріст культури лептоспир на поживному середовищі з додаванням різних серій досліджуваного препарату “Хітозан”

Препарат	Концентрація	3 доби		7 діб		Кон-троль (кіль-кість лептоспир)
		кількість лептоспир	% зв'язаних лептоспир	кількість лептоспир	% зв'язаних лептоспир	
Хітозан №1	2,5%	50	5	50	10	70
	1,0%	50	5	60	5	
	0,5%	50	2	60	-	
	0,1%	40	2	40	-	
	0,05%	50	2	40	-	
Хітозан №2	2,5%	30	40	30	30	80
	1,0%	50	30	50	30	
	0,5%	60	20	60	20	
	0,1%	80	5	70	5	
	0,05%	80	5	70	5	
Хітозан №3	2,5%	30	15	30	20	80
	1,0%	40	15	40	15	
	0,5%	50	5	40	5	
	0,1%	70	5	60	5	
	0,05%	70	5	60	5	

Числові значення в таблиці – накопичення лептоспир у темному полі зору мікроскопа (збільшення мікроскопа 10*40)

Висновки:

1. Всі досліджені серії хітозану виявляють сорбційну дію на лептоспіри.
2. Кращі перспективи використання в якості ад'юванту, з досліджених зразків хітозану, має «Сукцинат хитозана (сублимационная сушка)» (мМ – 330 кДа, СД -85%).

Перспективи подальших досліджень полягають в дослідженні сорбційних та антибактеріальних, ад'ювантних та імуномодельючих властивостей різних серій водорозчинного хітозану при створенні дослідних зразків протилептоспірної вакцини та щепленні нею лабораторних тварин.

1. Инструкция по изготовлению и контролю поливалентной вакцины “ВГНКИ” против лептоспироза животных. Утв. Глав. упр. вет. МСХ СССР 6.03.84.
2. Воробьев А.А. Адьюванты / А.А.Воробьев, Н.Н.Васильев. – М., 1969.
3. Li X. Investigation on process parameters involved in preparation of poly-DL-lactide-poly(ethylene glycol) microspheres containing *Leptospira Interrogans* antigens / X.Li, X.Deng, W.Jia // Int. J. Pharm. –2000. –Vol. 178. –№ 2. –P. 245–55.
4. Албулов А.И. Разработка промышленных технологий производства сорбентов и биологически активных препаратов из гидробиотнов для ветеринарии и других отраслей народного хозяйства: Автореф. дис.... докт. биол. наук: 03.00.23 / ГНУ ВНИИТИБП РАСХН. – Щелково, 2004. –59с.
5. Албулов А.И. Опыт применения препаратов хитозана в сельском хозяйстве /А.И. Албулов, М.А. Фролова, В.П. Варламов и др. // Научные основы производства ветеринарных биологических препаратов: доклад / Междунар. научно-практ. конф., Щелково, декабрь 2006 г. – Щ., ВНИИТИБП, –2006. – С.257–261.
6. Немцев С.В. Хитин и хитозан. Получение, свойства, применение / С.В.Немцев, И.Д.Адвиненко, В.П.Варламов, К.Г.Скрябин // Материалы шестой международной конференции. –М.: ВНИРО, 2001. –С. 94.
7. Бычков А.В. Применение «Хитана» в клинической практике / А.В.Бычков, В.М.Бычкова, Л.И.Кривошеина // Современные перспективы в исследовании хитина и хитозана. Материалы 7 международной конференции. Под ред.: В.П. Варламова и др. –М.: ВНИРО, 2003. – С.156–157.
8. Кузнецов П.А. Изучение иммуномодулирующих свойств сукцината хитозана / П.А.Кузнецов, А.И.Албулов, В.И.Клюкина и др. // Ветеринария и кормление. – №5. – М., 2007. – С.12-13.
9. Кузнецов П.А. Разработка способа разделения хитозана на низкомолекулярные фракции и изучение их биологических свойств: Автореф. дисс. на соискание науч. степени канд. биол. наук: спец. 03.00.23, 16.00.03/ П.А. Кузнецов. – Щёлково, 2008. – 22 с.
10. Албулов А.И. Исследование адьювантных свойств сукцината хитозана / А.И.Албулов, С.М.Шинкарев, П.А.Кузнецов // Современные перспективы в исследовании хитина и хитозана. VIII Международная конференция.– Казань, 2006.– С.140–141.

**ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОРБЦИОННЫХ СВОЙСТВ ХИТОЗАНА ПО
ОТНОШЕНИЮ К ЛЕПТОСПИРАМ / Уховский В.В., Голуб Ю.С., Албулов А.И.**

В последние десятилетия в мире наблюдается значительный интерес к природным биополимерам. Наиболее перспективными считают хитин/хитозан, которые привлекают к себе внимание не только благодаря комплексу физико-химических и биологических свойств, а и практически не ограниченной возобновляемостью сырьевой базы. Проиллюстрированы данные определения сорбционных свойств трех серий водорастворимого хитозана по отношению к вакцинному штамму лептоспир. Установлено что все апробированные серии хитозана (в условиях invitro) в концентрациях 2,5% и 1,0% связывают лептоспиры в группы по 3-40 микробных клеток.

Ключевые слова: лептоспира, вакцина, адъювант, природные биополимеры, хитозан.

**DETECTION OF ABSORPTION PROPERTIES OF CHITOSAN
ACCORDING TO LEPTOSPIRA / Uhovsky V.V., Golub Ju.S., Albulov A. I.**

In recent decades there is considerable interest in the natural biopolymers in the world. The most promising are the chitin / chitosan, which attract the attention not only due to the complex physical, chemical and biological properties, but practically unlimited renew ability of raw materials. Illustration data are shown on detection of absorption properties of three water-soluble chitosan's series according to vaccine leptospira strain. It was resulted that all researched series of chitosan (in vitro) bind leptospira better in groups of 2-40 microbial cells in concentration 2,5% and 1,0%.

Key words: leptospira, vaccine, adjuvant, natural biopolymers, chitosan.

Рецензент – кандидат ветеринарных наук У. М.Яненко