

УДК:619 : 620.3

**В. П. РИЖЕНКО**, доктор ветеринарних наук, професор, член-кореспондент НААН

**Г. Ф. РИЖЕНКО**, кандидат біологічних наук

**О. І. ГОРБАТЮК**, кандидат ветеринарних наук

**В. О. АНДРІЯЩУК**, кандидат ветеринарних наук

**С. М. ТЮТЮН, В. А. ТЮТЮН, О. М. ЖОВНІР, Т. М. МАЗИГУЛА,**

**П. П. КАМЕНЧУК, О. В. РУДОЙ, Н. А. ТЕПЛЮК, Л. С. МІЛЬКО**

*Інститут ветеринарної медицини НААН України (м. Київ)*

### **ТЕОРЕТИЧНЕ ТА ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНЕ ОБГРУНТУВАННЯ ВИКОРИСТАННЯ НАНОТЕХНОЛОГІЙ ДЛЯ СТВОРЕННЯ ІМУНОБІОЛОГІЧНИХ ПРЕПАРАТІВ**

*У статті висвітлені пошукові дослідження авторів з питань впливу нанопрепаратів Феруму, Купруму, Аргентуму та Цинку на культурально-морфологічні, біохімічні і біологічні властивості мікроорганізмів та на організм білих мишей. Виготовлені експериментальні зразки моновакцин: «Наноферумколісан», «Нанокупрумколісан», «Наноаргентумколісан», «Наноцинкумколісан» та розпочато їх вивчення.*

*Ключові слова: нанопрепарати Феруму, Купруму, Аргентуму, Цинку, вакцини, нешкідливість, нетоксичність.*

Тенденції глобального розвитку нанотехнологій у світі, зокрема у високорозвинених країнах – Японії, Китаї, США та ін., свідчать про актуальність цієї проблеми для гуманної та ветеринарної медицини [1 – 3].

Поряд з нанотехнологіями велику увагу вчених привертає така актуальна проблема, як нанобактерії. Виявлена здатність останніх викликати біомінералізацію, запалення та інші процеси. Встановлена геномна спорідненість нанобактерій з бактеріями бруцельозу, бартонели. Існує думка вчених, що нанобактерії можуть мати відношення до туберкульозу. Дослідження в цьому напрямку можуть призвести до перегляду лікувальних стратегій в медицині і ветеринарії [4 – 6].

Ряд зарубіжних науковців вивчають можливість застосування наночастинок металів в концентраціях, які б забезпечували стимуляцію культуральних, репродуктивних та біологічних властивостей виробничих штамів мікроорганізмів у технологіях виготовлення імуностимулюючих препаратів різного профілю [7, 8].

Отже, дослідження з проблем нанотехнологій і нанобактерій є актуальними. Оскільки одним із напрямків роботи лабораторії анаеробних інфекцій є розробка, виготовлення та впровадження у виробництво профілактичних засобів, постало питання застосування новітніх нанотехнологій для удосконалення існуючих та за розробки нових вакцинних препаратів. Співробітниками лабораторії було теоретично обґрунтовано та визначено можливість і напрямки щодо використання нанопрепаратів при створенні протиінфекційних профілактичних засобів.

**Метою** нашої роботи було проведення досліджень стосовно можливості застосування нанорозчинів металів: Феруму, Цинку, Купруму та Аргентуму для стимуляції росту мікробних культур і накопичення більших об'ємів бактеріальної маси збудників, що входять до складу, виготовлених за традиційними технологіями вакцин та проведення повного внутрішнього контролю таких препаратів із визначенням величини рН, повноти інактивації, відсутності контамінації сторонньою мікрофлорою та грибами, нетоксичності, нешкідливості виготовлених вакцинних препаратів.

**Матеріал і методи.** Дослідження проведено на базі лабораторії анаеробних інфекцій ІВМ та Державного науково-дослідного інституту лабораторної діагностики та ветеринарно-санітарної експертизи.

У досліджах використано нанопрепарати металів Феруму, Цинку, Купруму та Аргентуму у вигляді колоїдних нанорозчинів певної концентрації. Постачальником останніх була кафедра технології конструкційних металів і матеріалознавства (зав. кафедрою Лопатько К. Г.) НУБіП України.

Перевірку відповідності концентрації наночастинок у представлених колоїдах проведено на атомно-адсорбційному спектрофотометрі з полум'яною атомізацією «VARIAN-55».

У досліджах використано близько 500 гол. інбредних білих мишей .

В якості тест-культури використовували задепонований музейний штам *E. coli* штам «Рассвет-165».

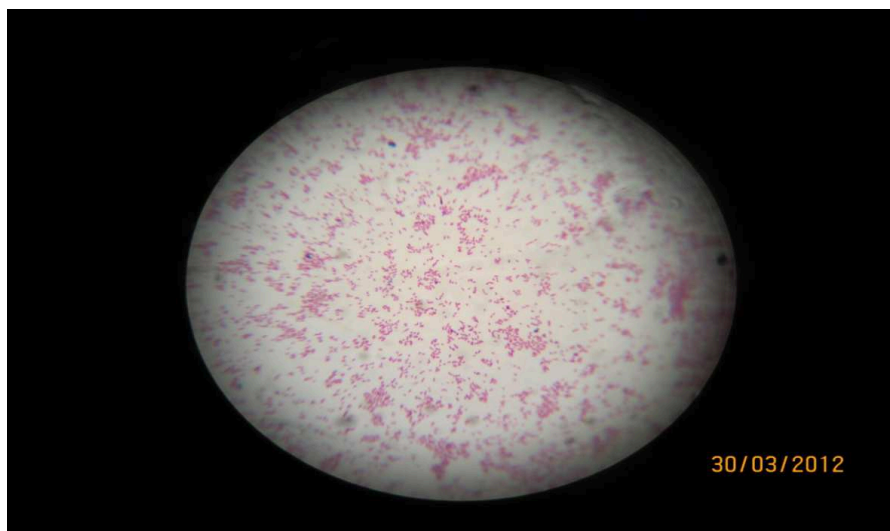
З метою виявлення стимуляції чи інгібіції росту тест-культури за дії нанопрепаратів нами застосовано кількісний метод підрахунку колоній на чашках із середовищем Ендо після посіву на нього десятикратних розведень (від  $10^2$  до  $10^9$ ) за культивування дослідної культури ешерихій в присутності нативних і кожної із робочих концентрацій нанопрепаратів через 15 хв. контакту, через 24 та 48 год. Після проведення підрахунків колоній, їх кількість множили на розведення та визначали середнє значення щодо кількості живих мікроорганізмів для кожної концентрації нанопрепарату зокрема. В досліді використано близько 1200 чашок із середовищем Ендо.

Застосовано методи досліджень: морфологічні, бактеріологічні, біохімічні, біологічні, варіаційно-статистичні.

**Результати досліджень.** Результати перевірки на відповідність концентрацій одержаних нанорозчинів на атомно-адсорбційному спектрофотометрі показали розбіжності із показниками, заявленими постачальником. За одержаними результатами випробувань концентрація Феруму у нативному нанорозчині складала 15,89 мг / л; Цинку – 28,85 мг / л; Аргентуму – 7,995 мг / л та Купруму – 0,39 мг / л. Подальші дослідження нами проведено із урахуванням одержаних показників щодо кількісного вмісту наночастинок металів у колоїдних розчинах.

Нами досліджено вплив нативних нанорозчинів та їх послідовних робочих розведень на морфологію клітин тест-культури *E. coli*. За аналізом результатів мікроскопічних досліджень мазків, виготовлених із культур

збудника після контакту тривалістю 15 хв., через 24 і 48 год. культивування в термостаті за 37<sup>0</sup>С встановлено, що незалежно від тривалості контакту та дії нативних нанопрепаратів Феруму, Цинку, Купруму та Аргентуму і їх робочих розведень морфологія клітин дослідної культури не змінювалася. Не виявлено будь-якого впливу нанопрепаратів на тинкторіальні властивості збудника за фарбування мазків розчинами анілінових фарб (рис. 1). В полі зору спостерігалися однотипові Г(-) палички, що засвідчувало толерантність нанопрепарату стосовно впливу на пофарбування за Грамом.



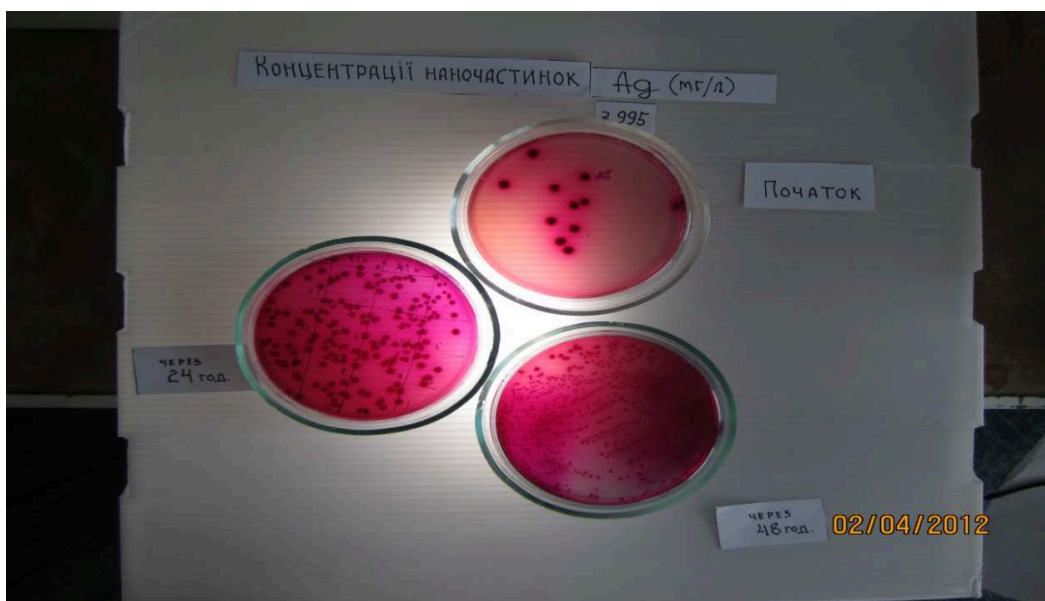
**Рис. 1 Морфологія клітин *E. coli* після 24 год. контакту із нативним нанопрепаратом Аргентуму**

Характеристика культурального росту дослідної тест-культури ешерихії за порівняння із ростом контрольної культури на звичайних живильних середовищах МПА, МПБ і середовищі Ендо не відрізнялася за формою, величиною, консистенцією колоній та засвідчувала відсутність негативного впливу нанопрепаратів і їх робочих розчинів на ріст і розвиток ешерихій, незалежно від терміну контакту. За аналізом результатів біохімічних досліджень зразків тест-культури, відібраних через 15 хв. контакту, через 24 та 48 год. сумісного культивування культури із нативним та робочими розведеннями нанопрепаратів Феруму, Цинку, Купруму і Аргентуму встановлена відсутність негативного впливу нанометалів на ферментативні властивості *E. coli*. (рис. 3).



**Рис.3** Культура *E. coli* штам «Рассвет–165» через 24 год. контакту із робочими розчинами нанопрепарату Цинку

Незалежно від терміну контакту із нанопрепаратами збудник зберігав протеолітичні, цукролітичні та гемолітичні характеристики (рис. 4).



**Рис. 4** Ріст культури *E. coli* на середовищі Ендо за різних термінів контакту мікробних клітин із нативним нанорозчином Аргентуму в концентрації 7,995 мг/л

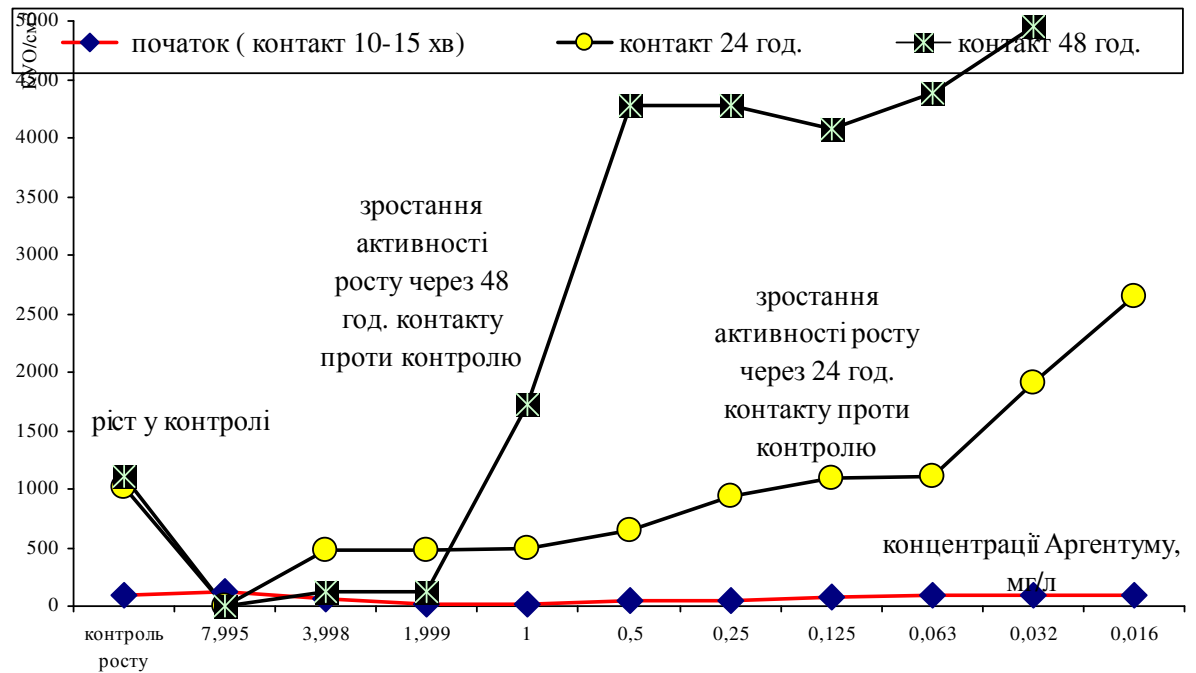
За результатами досліджень стосовно визначення токсичного впливу нативних і робочих концентрацій нанорозчинів Феруму, Цинку, Купруму та Аргентуму на організм інбредних білих мишей, виявлено відсутність токсичності нанопрепаратів Феруму в концентраціях від 15,890 до 0,125 мг / л, Цинку від 28,850 до 0,056 мг / л, Купруму від 0,390 до 0,0008 та Аргентуму від 7,995 до 0,032 мг / л (рис. 5).



**Рис. 5 Дослідження токсичності нанопрепарату Купрум та його робочих розведень**

За результатами досліджень стосовно впливу нанопрепаратів Феруму, Цинку, Купруму та Аргентуму на стимуляцію росту дослідної культури *E. coli* з метою накопичення більших об'ємів бактеріальної маси при виготовленні вакцин, найбільший інтерес викликає нанорозчин Аргентуму. Як видно на рис. 6, за порівняльного аналізу активності росту збудника через 15 хв контакту дослідної культури із різними концентраціями наночастинок Аргентуму та інтактною контрольною культурою збудника, що росла на звичайному середовищі, кількісні показники вмісту патогену в 1 см<sup>3</sup> середовища майже не відрізнялися.





**Рис. 6 Особливості росту добової культури *E. coli* за різних термінів контакту із розчинами наночастинок Аргентуму різної концентрації**

Через 24 год сумісного культивування дослідної культури із нанометалом спостерігалася значна активізація її росту за концентрації нанопрепарату від 0,063 до 0,016 мг / л. Через 48 год. контакту у дослідних пробірках з нанопрепаратом Аргентуму, особливо за його концентрацій від 1,000 до 0,032 мг / л, спостерігалася різке зростання мікробного навантаження на  $1,0 \text{ см}^3$ , що вірогідно перевищувало загальну кількість бактерій у контролі від 1,5 до 4,5 разів ( $P < 0,05$ ).

Стосовно стимулюючих властивостей нанорозчинів Цинку і Купруму, то вони були менш активними за порівняння із наночастинками Аргентуму. Крім того, проведені дослідження показали, що за контакту дослідної культури ешерихії із нанопрепаратом Феруму в різних робочих концентраціях спостерігалася утворення дрібнозернистих пластівців, які розбивалися при струшуванні і знову утворювалися через незначний проміжок часу та, ймовірно, впливали на показники активності росту дослідної культури.

Із вирощеної бактеріальної маси ешерихій в присутності нативних нанопрепаратів Феруму, Цинку, Купруму і Аргентуму та їх робочих розчинів нами виготовлено експериментальні зразки моновалентних вакцин під умовною назвою «Наноферумколісан», «Наноцинкумколісан», «Нанокупрумколісан», «Наноаргентумколісан (рис. 7).



**Рис. 7. Вакцинні препарати «Нанофероколісан» із вмістом різних концентрацій наночастинок Феруму**

Виготовлені експериментальні зразки нановакцин пройшли внутрішній контроль із визначенням концентрації водневих іонів (рН), яка в дослідних вакцинних препаратах коливалася в допустимих межах від 7,15 до 7,35. Залишкова концентрація формальдегіду не перевищувала допустимих меж та варіювала від 0,006 до 0,007 %. Проведено контроль та підтверджено повну інактивацію нановакцинних препаратів за відсутністю специфічного росту на живильних середовищах та при повній збереженості інбредних білих мишей і морських свинок за введення дослідних нановакцин.

Встановлена відсутність контамінації нановакцинних препаратів живими мікроорганізмами та мікроскопічними грибами за посіву нановакцин на спеціальні живильні середовища.

Результати досліджень експериментальних зразків нановакцин на інбредних білих мишах засвідчили їх не токсичність. Зразки зконструйованих нановакцин були нешкідливими так, як середня жива маса по групах тварин вірогідно зростала упродовж десяти діб спостереження, отже препарат не впливав негативно на метаболічні процеси у інбредних білих мишей.

### **Висновки.**

1. За результатами пошукових досліджень експериментально доведена доцільність продовження досліджень з вивчення можливості застосування нанопрепаратів для виготовлення вакцин.

2. Виявлено, що за різних термінів контакту культури *E. coli* та нативних нанопрепаратів Феруму в концентрації 15,89 мг / л, Цинку в концентрації 28,85 мг / л, Купруму в концентрації 0,39 мг / л, Аргентуму в концентрації 7,995 мг / л і їх робочих розчинів, останні проявляють індиферентність стосовно впливу на морфологічні, бактеріологічні, біохімічні та біологічні властивості патогенного збудника, що дозволяє їх безпечно застосовувати.

3. Встановлено, що нанопрепарати Аргентуму в концентраціях від 1,000 до 0,032 мг / л були ефективними стимуляторами культурального росту дослідного штаму *E. coli*, що сприяло збільшеному виходу бактеріальної маси із одного і того ж об'єму живильного середовища під час виготовлення вакцин при порівнянні із аналогічними показниками росту інтактною культури збудника.

4. Встановлено, що виготовлені на основі нанопрепаратів Феруму, Цинку, Купруму і Аргентуму зразки ешеріхіозних нановакцин відповідали усім вимогам щодо внутрішнього контролю імунобіологічних препаратів – показники рН 6.15 – 7.35 ; вміст вільного формальдегіду на рівні 0.006 – 0.007 %; були стерильними та відсутня контамінація живими мікроорганізмами і мікроскопічними грибами. Експериментальні зразки нановакцин були нетоксичними та нешкідливими.

**Перспективи подальших досліджень.** Продовжити дослідження експериментальних зразків нановакцин стосовно їх впливу на антигенну активність та імуногенну ефективність за порівняння із аналогічними показниками за застосування вакцинних препаратів, виготовлених за традиційними технологіями.

### Список використаної літератури

1. Тютюн В. А. Вплив нанопрепаратів на метаболічні процеси у мікроорганізмів / В. А. Тютюн // Ветеринарна біотехнологія. – Бюл. № 19. – 2011. – 243 с. – Бібліограф.: С. 195 – 201.

2. Борисевич В. Б. Застосування частинок Ag, Cu, Zn у лікуванні ран / В. Б. Борисевич, Б. В. Борисевич, О. Ф. Петренко та ін. // Здоров'я і ліки. – С. 14 – 15;

3. Волошина Н. Перспективи застосування колоїдів наночастинок металів у ветеринарній медицині / Н. Волошина, В. Каплуненко, М. Косінов // Вет. мед. України. – № 9. – 2008. – С. 32 – 34.

4. Salata O. V. Application of nanoparticles in biology and medicine [Электронный ресурс]. Режим доступа: <http://www.jnanobiotechnologie.com/content/2/1/3>.

5. Бабушкина И. В. Изучение антибактериального действия наночастиц меди и железа на клинические штаммы *Staphylococcus aureus* / И. В. Бабушкина, В. Б. Бородулин, Г. В. Кошунов, Д. М. Пучиньян // Саратовский науч. медиц. журнал. – 2010. – Т. 6. – № 1. – С. 11 – 14.

6. Богословская О. А. Влияние наночастиц меди и железа на рост микробных клеток / О. А. Богословская, А. Б. Астротина, Т. А. Байтукалов и др. // Науч.-практ. конф. «Новая технологическая платформа биомедицинских исследований (биология, здравоохранение, фармацевтика)». – Ростов-на-Дону, 2006. – С. 72 – 73.

7. Sahoo S. K. The present and future of nanotechnology in human health / S. K. Sahoo, S. Parvttin, J. J. Panda // Nanomedicine. – 2007. – N 3. – P. 20 – 31.



8. *Chah S.* Gold nanoparticles as a colorimetric sensor for protein conformational changes / S. Chah, M. R. Hammond, R. N. Zake // *Chemistry & Biology*. – 2005. – Vol. 12. – P. 323 – 328.

**ТЕОРЕТИЧЕСКОЕ И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ОБОСНОВАНИЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ НАНОТЕХНОЛОГИЙ ДЛЯ СОЗДАНИЯ ИММУНОБИОЛОГИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ / Рыженко В. П., Рыженко Г. Ф., Горбатюк О. И., Андрияшук В. А., Тютюн С. Н., Тютюн В. А., Жовнир А. М., Мазыгула Т. Н., Каменчук П. П., Рудой А. В., Теплюк Н. А., Милько Л. С.**

*В статье освещены поисковые исследования авторов по вопросам влияния нанопрепаратов Ферума, Купрума, Аргентума и Цинка на культурально-морфологические, биохимические и биологические свойства микроорганизмов и на организм белых мышей. Изготовлены экспериментальные образцы моновакцин: «Наноферумколисан», «Нанокупрумколисан», «Наноаргентумколисан», «Наноцинкумколисан» и начато их изучения.*

*Ключевые слова: нанопрепараты железа, меди, Аргентума, цинка, вакцины, безвредность, нетоксичность.*

**THEORETICAL AND EXPERIMENTAL STUDY FOR CREATING USING NANOTECHNOLOGY IMMUNOBIOLOGICAL PREPARATIONS/ Ryzhenko V. P., Ryzhenko G. F., Gorbatyuk O. I., Andriyashuk V. A., Tyutyun S. N., Tyutyun V. A., Zhovnir A. M., Mazigula T. N., Kamenchuk P. P., Rudoy O. V., Teplyuk N. A., Milko L. S.**

*In the article the authors exploratory research on the effects of nanopreparation iron, copper, and zinc Arhentum culturally and morphological, biochemical and biological properties of microorganisms and the body white mice. Experimental samples monovaktsyn "Nanoferumkolisan", "Nanokuprumkolisan", "Nanoarhentumkolisan", "Nanotsynkumkolisan" and began to study them.*

*Keywords: nanopreparation iron, copper, Arhentumu, zinc, vaccines, harmless, non-toxicity.*

**Рецензент: доктор ветеринарных наук В. Л. Коваленко.**

Рукопис надійшов 26. 07. 2013р.