

**КОНСТРУЮВАННЯ АНТИБАКТЕРІАЛЬНИХ ПОКРИТЬ ДЛЯ БІОКЕРАМІКИ
ЗА БІОМІМЕТИЧНИМ ПРИНЦИПОМ: МАС-СПЕКТРОМЕТРИЧНІ
ТА ЕЛЕКТРОННО-МІКРОСКОПІЧНІ ДОСЛІДЖЕННЯ**

Суходуб Л.Ф.³, Волянський А.Ю.¹, Бордунова О.Г.², Пилюгін С.В.¹, Чіванов В.Д.³,
Кучма І.Ю.¹

¹ Інститут мікробіології та імунології ім. І.І. Мечникова АМН України,
м. Харків, Україна

² Сумський національний аграрний університет, м. Суми, Україна

³ Інститут прикладної фізики НАН України, м. Суми, Україна

Сконструйована «штучна кутикула» (ARTICLE) для біокерамічних кальцитних шарів шкаралупи інкубаційних яєць птахів, яка складається зі сполук четвертинного амонію (ЧАС), пероксидів та біоактивних рослинних препаратів (РЕ). Мас-спектрометрією та електронною мікроскопією досліджені її морфологічні параметри. Винайдений оптимальний склад робочого розчину для отримання «штучної кутикули»: сполука четвертинного амонію алкілдиметилбензиламоній-хлорид (АДМБ) + надоцтова кислота (НОК) + рослинний екстракт (РЕ).

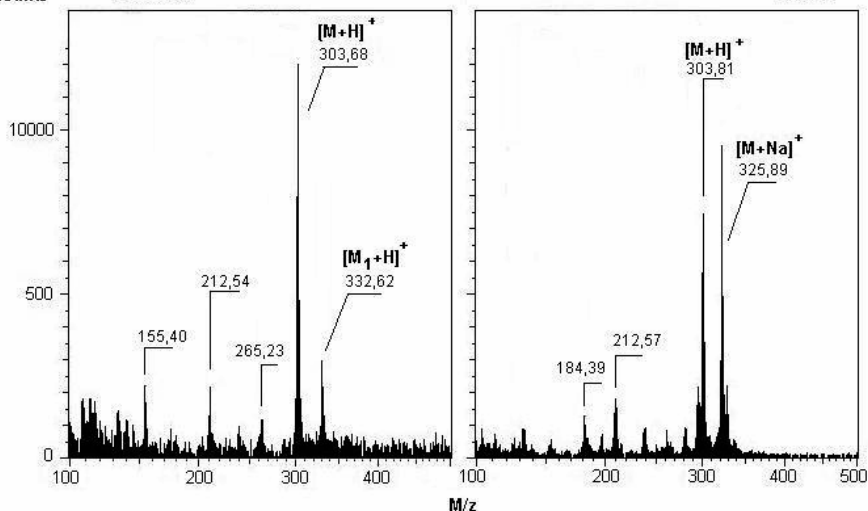
Вступ. Підвищення продуктивності сільськогосподарських птахів, в першу чергу яєчних кросів курей, негативно корелює із погіршенням бар'єрних функцій біокерамічних кальцитних шарів яєчної шкаралупи і поверхневої глікопротеїної плівки кутикули, яка являє собою першу «захисну лінію» пташиного яйця [1–3]. Послаблення бар'єрних функцій, в свою чергу є важливим чинником, який сприяє підвищенню захворюваності птахів на небезпечні інфекційні хвороби, спричинені бактеріальними і вірусними агентами [4]. Зважаючи на це, певних перспектив набуває новий підхід до захисту інкубаційних яєць сільськогосподарських птахів проти вторинної контамінації збудниками небезпечних хвороб, сутність якого полягає в утворенні на поверхні яєць «штучної кутикули» (*ARTIficial cutiCLE: ARTICLE*) [5, 6]. *ARTICLE* являє собою газопроникну гетерокомпонентну тонкошарову еластичну плівку завтовшки 0,5–15 мкм, яка в морфологічному і функціональному сенсах є штучним аналогом природної кутикули пташиного яйця – глікопротеїдної плівки, котрій притаманні антибактеріальні властивості і яка надійно захищає яйце від патогенної мікрофлори [7, 8]. Зазначимо, що протягом останнього десятиріччя активно розробляються технології керованого вивільнення іmobilізованих біологічно активних речовин “*Control Release Technique*” зі штучних полімерних носіїв-матриць до живих тканин [9–11]. Зважаючи на це, ми ввели до складу *ARTICLE* разом з біоцидними сполуками біологічно активні речовини-біостимулятори та імуностимулятори природного та штучного походження, які протягом терміну інкубації поступово, із заданими попередньо швидкостями (обумовленими хімічним складом носія-матриці), надходять всередину яйця до зони розвитку ембріону через біокерамічні шари шкаралупи. Водночас спеціалізовані компоненти “*ARTICLE*” полегшують газообмін ембріону протягом інкубації. Технологія “*ARTICLE*” дозволяє поєднати пролонговану біоцидну (антибактеріальну та противірусну) активність зі здатністю коригувати розвиток ембріонів протягом інкубації та підвищувати ступінь імунітету птахів щодо інфекційних хвороб в постембріональний період.

Таким чином, **метою нашої розробки** було конструювання і мас-спектрометричне і електронно-мікроскопічне дослідження антибактеріальної “штучної кутикули” (*ARTICLE*) яка вкриває біокерамічний шар шкаралупи пташиного яйця на основі “біоміметичного” моделювання глікопротеїнової кутикули як природного захисного утворення. За базові складові *ARTICLE* правили сполуки четвертинного амонію (ЧАС) у суміші з надоцтовою кислотою (НОК) та біоактивними препаратами рослинного походження (рослинні екстракти – РЕ).

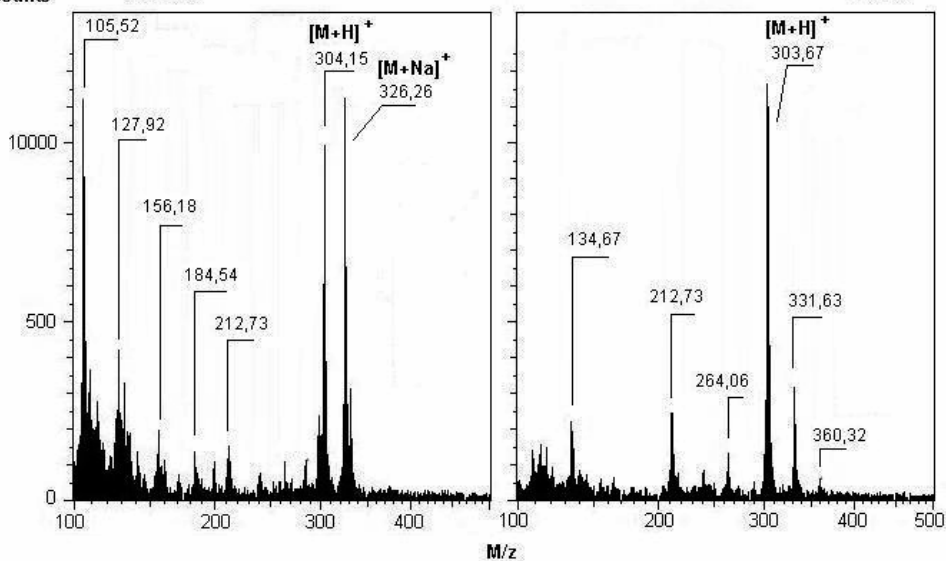
Матеріали та методи. В експериментах використовували інкубаційні яйця курей (Домінант бурий Д-102; 15 тиждень яйцекладки); сумарний рослинний екстракт (РЕ), який складався з рівних об'ємів екстрактів, отриманих з таких біологічно-активних компонентів: горіху волоського – *Juglans regia*; елеутерококу колючого – *Eleuterococcus senticosus* Maxim; ехіноцеї пурпурової – *Echinacea purpurea* Moench.; звіробою звичайного – *Hypericum perforatum* L.; золотого кореня – *Rhodiola rosea* L.; лимоннику китайського – *Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill.; нагідок лікарських (календули) – *Calendula officinalis* L.; обліпихи крушиноподібної – *Hippophaë rhamnoides* L.; полину гіркою – *Artemisia absinthium* L.; ромашки лікарської – *Matricaria recutita* (*Chamomilla*) L.; сосни лісової – *Pinus silvestris* L.; тополі чорної – *Populus nigra* L.; хмелю звичайного – *Humulus lupulus* L.; ялівця звичайного – *Juniperus communis* L.; екстракту з виноградних кісточок (10 % водний розчин); водорозчинні ЧАС (алкілдиметилбензиламоній-хлорид (АДМБ), додецилдиметилбензиламоній-хлорид (ДДМБ) “Sigma”, США), надоцтова кислота (НОК), х.ч. Робочий розчин для приготування “штучної кутикули” отримували, додаючи до 850 мл РЕ 100 мл 5% розчину відповідного ЧАС та, де зазначено 50 мл 20% НОК з наступною обробкою ультразвуком в лабораторній ультразвуковій бані 1,5 Вт/см², протягом 5 хв. «Штучну кутикулу» на поверхні інкубаційних яєць одержували шляхом обприскування яєць робочим розчином (діаметр крапель аерозолу 50–200 мкм) з наступним висиханням розчину і утворенням твердофазової плівки. Після висихання водного шару розчинів на поверхні шкаралупи яєць видобували зразок з середньої частини контрольних яєць, площею 2–6 мм², які аналізували растровою електронною мікроскопією („РЕММА-102”, ВАТ SELMI, Суми, Україна). Решту оброблених препаратами яєць закладали на інкубацію згідно загальноприйнятої технології. Після виведення курчат зразки шкаралупи аналізували як наведено вище. Органічні складові “ARTICLE” досліджували мас-спектрометричним методом (мас-спектрометр з іонізацією уламками поділу ²⁵²Cf “МСБХ”, ВАТ «SELMI», Суми, Україна). Статистичну обробку експериментального матеріалу проводили на основі пакетів Statistica v.5.11 for WIN95/NT.

Результати та обговорення. Попередніми роботами доведено, що препарати на основі сполук четвертинного амонію утворюють на поверхні твердої фази, прикладами якої можуть бути елементи конструкцій птахівничих приміщень, тара, інкубаційні яйця, тощо, захисну плівку, якій притаманні біоцидні та антистатичні активності щодо аерогенної патогенної мікрофлори і високий ступінь проникності для газів (O₂, CO₂) і вологи [12]. В літературі є поодинокі результати щодо мікроструктури плівок, які утворюють на поверхні твердофазових структур дезінфектанти на основі поверхнево-активних речовин [13]. Раніше нами були отримані дані щодо мікроструктури тонкошарових плівок препаратів, активними речовинами котрих є алкілтриметиламоній-хлорид, алкілдиметилбензиламоній-хлорид та додецилдиметилбензиламоній-хлорид [14]. Останнє спонукало нас вдосконалити склад препаратів, діючі речовини яких належать до цієї групи, додаванням рослинних екстрактів (РЭ) та надоцтової кислоти (НОК).

Першим питанням, яке потребувало вирішення, було встановлення ступеню деструкуючої активності НОК, як типового представника потужних окислювачів. Як видно з рис. 1, незважаючи на високу хімічну активність НОК, вона не піддає вираженій деструкції АДМБ (1, а) і ДДМБ (1, б). Молекулярна маса АДМБ дорівнює 303,6 а.о.м. (відповідає [M] на рис. 1, а), молекулярна маса ДДМБ дорівнює 332,5 а.о.м. (відповідає [M₁] на рис. 1, б).



a

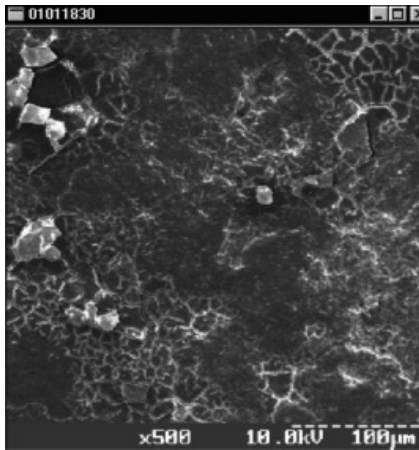


б

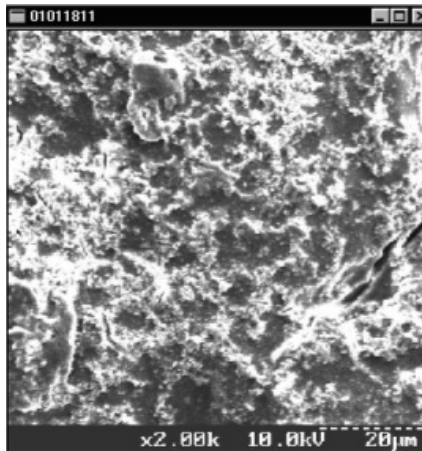
Рис. 1 Мас-спектри PDMS алкілдиметилбензиламоній-хлориду (АДМБ) (чиста речовина (ліворуч) і за умов додавання надоцтової кислоти (НОК) (праворуч) (а) та дидиметилбензиламоній-хлориду (ДДМБ) (чиста речовина (ліворуч) і за умов додавання надоцтової кислоти (НОК) (праворуч) (б); молекулярна маса АДМБ 303,6 а.о.м. (відповідає [M] на рис. 1, а), молекулярна маса ДДМБ - 332,5 а.о.м. (відповідає [M₁] на рис. 1, б).

В попередніх роботах нами було показано, що покриття інкубаційного яйця шаром біоцидних препаратів на основі ЧАС АДМБ або ДДМБ призводить до утворення на поверхні кутикули щільного шару, покритого звивистими мікротріщинами, що в значній мірі утруднює надходження до поверхні кутикули патогенної мікрофлори [5, 6, 12]. Сформована плівка є проникною для вологи та газів (O_2 та CO_2). На морфологічні особливості захисних плівок дезінфектантів на основі сполук четвертинного амонію сильний вплив здійснює загальний хімічний склад препаратів. Структурно-морфологічні параметри захисних плівок значно змінюються протягом інкубації внаслідок впливу чинників інкубації (зміни температури, вологості), а також метаболітів ембріону. В процесі розвитку ембріона шкаралупа стає більш тонкою, на поверхневому шарі шкаралупи вивільняється більша кількість мікрошпарин і це надає можливості надходженню складових препаратів в середину яйця. Імобілізовані на носіях ЧАС біологічно активні речовини з рослинних екстрактів вільно надходять в зону розвитку ембріона, позитивно впливаючи на його метаболічні процеси, пом'якшуючи дію амонійних сполук.

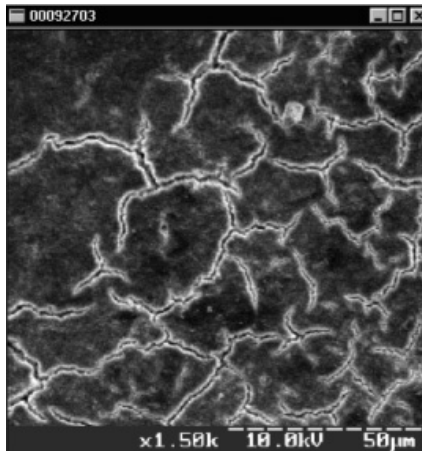
Модифікація АДМБ та ДДМБ біоактивними хімічними речовинами рослинного походження викликає перерозподіл зарядів на поверхні „штучної кутикули” який обумовлює підвищення величини заряду на крайових поверхнях мікро тріщин і надає здатність „штучній кутикулі” затримувати мікроорганізми у наслідок дії електростатичних сил. Базуючись на цьому, нами розроблені модифіковані суміші для одержання „штучної кутикули”, до складу яких входять водорозчинні ЧАС АДМБ, ДДМБ, рослинний екстракт (РЕ) і надоцтова кислота (НОК), яким властива виражена біоцидна активність, що зберігається протягом проміжку часу до 25–30 діб. Надоцтова кислота незалежно від хімічної природи ЧАС розпушує кристалічну кальцитну структуру шкаралупи, що полегшує газообмін ембріона протягом розвитку. На рис. 2, а наведена електронна мікрофотографія поверхні курячого яйця, обробленого аерозолем препарату (діюча речовина – ДДМБ) з додаванням рослинних екстрактів та надоцтової кислоти. Можна бачити, що плівка, яка утворилася при висиханні на поверхні цієї суміші має значно більшу кількість невеликих (від 16 до 25 мкм) шпарин завширшки до 5–8 мкм, через які надходять гази та пари води при одночасній затримці мікроорганізмів. На мікрофотографіях зразків шкаралупи, обробленої вищевказаною сумішшю з додаванням НОК спостерігається розрихлення поверхні за рахунок збільшення кількості мікрошпарин (рис. 2, б). Відповідна плівка, яка утворилася з АДМБ містить значно меншу кількість великих шпарин (завширшки 10–12 мкм) (рис. 3,б). Але при додаванні РЕ та НОК поверхня шкаралупи, вкрита плівкою, має більшу кількість шпарин та більш розрихлений вигляд, що позитивно впливає на проходження газів та вологи до зони розвитку ембріона. Таким чином, на морфологічні особливості захисних плівок дезінфектантів на основі ЧАС, сильний вплив здійснює загальний хімічний склад. Так, з рис. 2 витікає, що присутність у водному розчині діючої речовини ДДМБ призводить до повної зміни структури плівки – вона стає більш щільною та з меншою кількістю великих шпарин в порівнянні з препаратом, до складу якого входить інший поверхнево-активний інгредієнт. Логічним є питання, чи проходять інгредієнти препаратів через шари шкаралупи яйця. Останнє залежить від якісних параметрів самої шкаралупи. Так, з рис. 4 випливає, що в межах локального дефекту шкаралупи діючі речовини АДМБ і ДДМБ здатні надходити в кристалічний шар шкаралупи на глибину 20–50 мкм (на мікрофотографіях це відповідає світлим ділянкам).



а

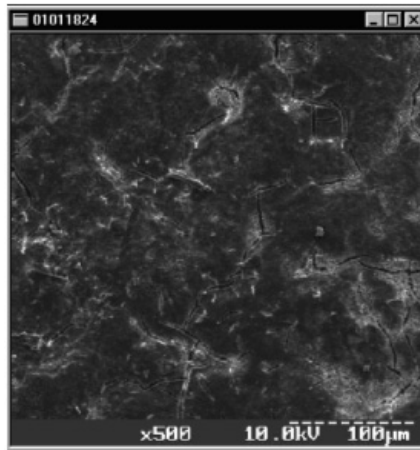


б

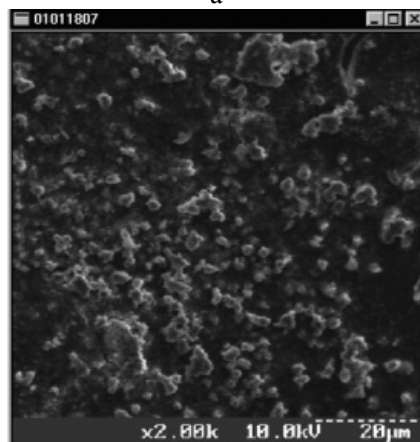


в

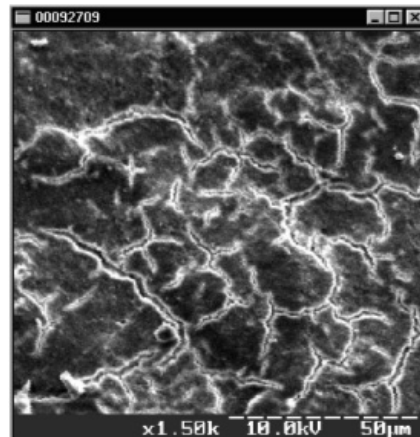
Рис. 2. Мікрофотографії поверхні шкаралупи інкубаційних яєць, оброблених препаратами: ДДМБ з додаванням НОК та РЕ: X500 (а); ДДМБ з НОК: X 2000 (б); ДДМБ: X1500 (в).



а

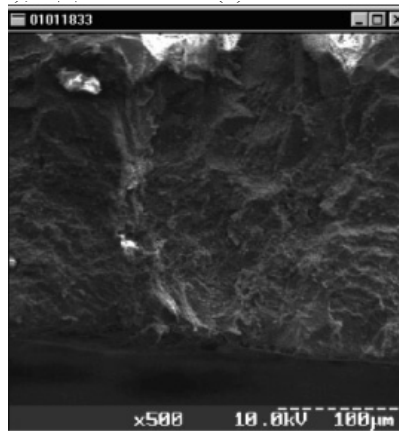


б

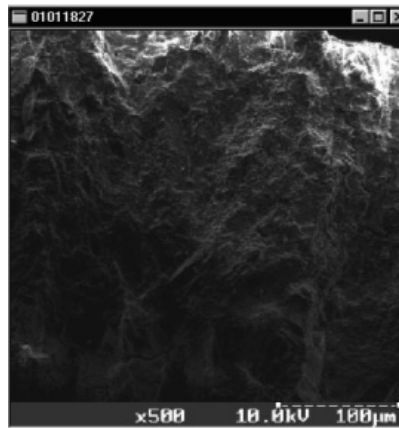


в

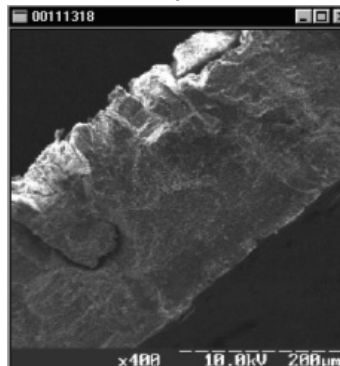
Рис. 3. Мікрофотографії поверхні шкаралупи інкубаційних яєць, оброблених препаратами: АДМБ з додаванням НОК та РЕ: X500 (а); АДМБ з НОК: X 2000 (б); АДМБ: X1500 (в).



a



б



в

Рис. 4. Мікрофотографії поверхні шкаралупи інкубаційних яєць по завершенні інкубації, оброблених препаратами: ДДМБ з додаванням НОК та РЕ: X500 (а); АДМБ з додаванням НОК та РЕ: X 500 (б), X 400 (в).

Електронні мікрофотографії, наведені на рис. 4, свідчать на користь того, що структура захисних плівок дійсно змінюється протягом інкубації. Так, плівка, що утворилася з препарату, діюча речовина якого АДМБ, доповнена РЕ та НОК (Рис. 4, б) під дією чинників інкубації, наведених вище, набула структури подібної аналогічному параметру, притаманному плівці, отриманої з іншого препарату, 482

що має діючу речовину ДДМБ (Рис. 4, а). Окрім того, інгредієнти АДМБ набули здатності надходити протягом інкубації до глибинних шарів бар'єрних систем яєць, заповнюючи мікродефекти останніх на глибину до 20 мкм (Рис. 4, в). Напевне, головними чинниками, що відповідають за зміну мікроструктури та реологічних властивостей захисних плівок, є підвищена температура і волога.

Таким чином, методом растрової електронної мікроскопії доведена здатність діючих речовин дезінфікуючих препаратів дезінфектантів АДМБ і ДДМБ утворювати на поверхні біокерамічної оболонки яйця – шкаралупі, щільні захисні антибактеріальні плівки. Суміш АДМБ із НОК підвищує проникність шкаралупи. Введення до складу препаратів біологічно активних екстрактів з рослин знижує деструктивну активність НОК. Вперше отримані результати на користь того, що мікроструктура захисних плівок та їх реологічні параметри змінюються протягом інкубації.

Методом скануючої електронної мікроскопії вивчені морфологічні особливості “штучних кутикул” *ARTICLE*, отриманих з сумішей на основі АДМБ і ДДМБ і встановлено, що найменша кількість поверхневих дефектів характерна для плівкоутворювальної суміші складу АДМБ+НОК+РЕ.

Висновки. Таким чином, препарати на основі сумішей ЧАС, рослинних екстрактів і пероксидів, зокрема надощової кислоти, є досить перспективними для використання у практиці, оскільки ЧАС утворюють на поверхні шкаралупи “штучну кутикулу” *ARTICLE*, що попереджає вторинну контамінацію, а пероксидний компонент – надощова кислота (НОК) просочує неорганічний матрикс, забезпечуючи надійну саніцію останнього від патогенної мікрофлори. Рослинний екстракт (РЕ) знижує деструктивну активність надощової кислоти щодо біокерамічного шару шкаралупи. Оптиміальний склад плівкоутворювальної суміші для отримання “штучної кутикули”: алкілдиметилбензиламоній-хлорид (АДМБ) + надощова кислота + рослинний екстракт.

Список літератури

- I. Arias, J. L. Handbook of biomineralization [Text] / Arias J.L., Fernandez M.S.; E. Baeuerlein, P. Behrens, M. Epple. – Weinheim (eds.). – Wiley : VCH, 2006. – Vol. 2. – P. 38–64. 2. Avian eggshell mineralization (Review) [Text] / Nys Y. [et al.] // Poultry and Avian Biology. – 1999. – Vol. 10. – P. 143–166. 3. Solomon, S.E. Egg and eggshell quality [Text] / Solomon S.E. – London : Wolfe Publ. Ltd., 1990. – 182 pp. 4. Romanoff, A.L. The avian egg [Text] / Romanoff A.L., Romanoff A.J. – New York : John Wiley & Sons, 1963. – 917 pp. 5. Бордунова, О.Г. Деякі аспекти молекулярного механізму біосидної дії дезінфектанта “ВВ-1” [Текст] / Бордунова О.Г., Байдевятов Ю.А., Чіванов В.Д. // Вісн. аграр. науки. – 1999. – № 12. – С. 43–45. 6. Екологічно безпечні дезінфектанти для птахівництва [Текст] / Бордунова О.Г. [та ін.] // Вісн. аграр. науки. – 2001. – № 7. – С. 30–33. 7. Peebles, E.D. The role of the cuticle in water vapor conductance by the eggshell of broiler breeders [Text] / Peebles E.D., Brake J. // Poultry Sci. – 1986. – Vol. 65, № 6. – P. 1034–1039. 8. Ar, A. Roles of water and gas exchange in determining hatchability success [Text] / Ar A. // Int. Hatchery Pract. – 2000. – Vol. 15, № 2. – P. 21. 9. Vogelhuber, W. Programmable biodegradable implants [Text] / Vogelhuber W., Rotunno P., Magni E. // J. Control. Release. – 2001. – Vol. 73. – P. 75–88. 10. Santus G., Osmotic drug delivery: a review of the patent literature (Review) [Text] / Santus G., Baker R.W. // J. Control. Release. – 1995. – Vol. 35. – P. 1–21. 11. Novel developments in liposomal delivery of peptides and proteins [Text] / Storm G. [et al.] // J. Control. Release. – 1995. – Vol. 36. – P. 19–24. 12. Bordunova, O.G. Experimental and theoretical studies of surface-active disinfectant for industrial poultry [Text] / Bordunova O.G., Baidevlatov A.B. // Quality of eggs and eggs products : Proc. Eur. Symp. (19–23 September, 1999, Bologna, Italy). – Bologna, 1999. – Vol. II. – P. 595–601. 13. Виєвський, А.Н. Механізми біологічного впливу катионних поверхнотно активних речовин [Текст] / Виєвський А.Н. – М. : Наука, 1991. – 250 с. 14. Бордунова, О.Г. Растрова електронна мікроскопія захисних плівок дезінфектантів на поверхні інкубаційних яєць [Текст] / Бордунова О.Г., Бондарчук Л.В., Чемерис І.І., Павленко П.О. // Вісн. Сумськ. держ. аграр. ун-ту. Сер. «Тваринництво». – 2001. – Вип. 5. – С. 22–29.

BIOMIMETIC DESIGNING OF ANTIBACTERIAL PROTECTIVE SURFACES FOR BIOCERAMIC: MASS SPECTROMETRIC AND ELECTRON MICROSCOPIC STUDY

Sukhodub L.F.³, Volyanskiy A.Yu.¹, Bordunova O.G.², Chivanov V.D.³.

¹ Mechnikov Institute of Microbiology and Immunology of Academy of Medical Sciences of Ukraine, Kharkiv, Ukraine. ² Sumy National Agrarian University, Ukraine. ³ Institute of Applied Physics of National Academy of Sciences of Ukraine, Sumy, Ukraine

The “artificial cuticle” (ARTICLE) for bioceramic calcite layers of the hatching eggs shell of the birds constructed from quaternary ammonium substances (QAS), peroxides and bioactive plant components (PE) and has been designed. By means of the mass spectrometry and scanning microscopy its morphological parameters are investigated. The optimum structure of the solution for obtaining of the “artificial cuticle” is established (quaternary ammonium compound alkyl dimethylbenzylammonium-chloride (ADBM) + peracetic acid (PAA) + plant extract (PE).