

Список літератури

1. Ducheyne, P. Structural analysis of hydroxyapatite coatings on titanium / P. Ducheyne, W. Van Raemdonck, J. C. Heughebaert, Heughebaert M. // *Biomaterials*. - 1986. - V. 7. - P. 97-103.
2. Covtun, A. Chlorhexidine-loaded calcium phosphate nanoparticles for dental maintenance treatment: combination of mineralizing and antibacterial effects / A. Covtun, D. Kozlova, K. Ganesan, C. Biewald, N. Seipold, P. Gaengler, W. H. Arnold, M. Eppe // *RSC Advances*. - 2012. - V. 2. - P. 870-875.
3. Hendriks J. Van 1 Iorn J. Van Der Mei II., Busscher II. // *Biomaterials*. - 2004. - V. 25. - P. 545-556.
4. Ley Song Antibacterial hydroxyapatite/chitosan complex coatings with superior osteoblastic cell responses / Ley Song, Lu Gan, Yan-Feng Xiao, Yao Wu, Zhong-Wei Gu // *Materials Letters*. - V. 65. - 2011. - P. 974-977.
5. Kraevska B. Application of Chitin and Chitosan-based materials for enzyme immobilization: a review/ Kraevska B. // *Enzyme and Microbial Technol.* - 2004. - Y. 35. - P. 126-139.
6. Noda I. Development of novel thermal sprayed antibacterial coating and evaluation of release properties of silver ions/ I. Noda, F. Miyaji, Y. Ando, H. Miyamoto, T. Shimazaki, Y. Yonekura, et al. // *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* - 2009. - V. 89B. - P. 456-465.
7. Marcos Diaz Synthesis and Antimicrobial Activity of Silver- Hydroxyapatite Nanocomposite / Marcos Diaz, Flora Barba, Miriam Miranda, Francisco Guitian, Ramon Torrecillas, and Jose S. Moya // *Journal of Nanomaterials*. - Article ID 498505. - 2009. - p. 1-6.
8. Noda I. Next Generation Antibacterial Hydroxy apatite Coating: Antibacterial Activity of Ag Ions in Serum / I. Noda, F. Miyaji, Y. Ando, H. Miyamoto, T. Shimazaki et al. // *Bioceramics Development and Application*. - 2011. - V. I. - p. I-3.
9. Sukhodub I. B. Improved Thermal Substrates Method with cooling System for on Titanium Substrate - I. B. Sukhodub, C. Moseke, L. F. Sukhodub, V. V. Pilipenko, B. Sulkio-Cleff // *Annual Report. Material Science. Institute of Nuclear Physic, Vilgelm University, Germany*. - 2003. - P. 86-88.
10. Яновская А.А. Получение хитозан-гидроксиапатитных покрытий для медицинских имплантатов / [А.А. Яновская, В.Н. Кузнецов, С.Н. Данильченко, Л.Ф. Суходуб] // *Біофізичний Вісник Харківського національного університету ім. В.Н. Каразіна*. — 2011. — Вип. 26, № 1. — С. 88—98.
11. Яновська Г.О. Покрытия для биомедицинского назначения на основе гидроксиапатита, хитозану та срібла / [Г.О. Яновська, В.М. Кузнецов, О.С. Станіславов, В.Ю. Ілляшенко] // *Хімія, фізика та технологія поверхні*. — 2012. — Т. 3, № 3. — С. 346—351.
12. Бактеріологічний контроль поживних середовищ: інформаційний лист МОЗ України. - Київ, 2000. - № 05.4.1/1670.
13. Стандартизація приготування мікробних суспензій: інформаційний лист МОЗ України. - Київ, 2006. - № 163.
14. Determination of density and numbers of cells in cell cultures [electronic resource] // Access Mode: <http://www.avantes.ru/methods/5.php>.
15. Warra A.A. Transition metal complexes and their application in drugs and cosmetics - A Review/ J. C. hem. Ph arm. Res. - V. 3 (4). - 2011. - p. 951-958.

ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF CHITOSAN AND SILVER IONS IN THE HYDROXYAPATITE COATINGS ON METALLIC IMPLANTS

Kuchma I.Yu., Sukhodub L.B., Melnik A.L., Parusov A.V., Chernyaeva T.A.

SI «Institute of Microbiology and Immunology I.I. Metchnikov NAMS of Ukraine», Kharkiv

Hydroxyapatite (HA) coatings improve the process of the osteointegration of metallic implants in bone tissues. To reduce the risk of implant-associated infections into the HA based coatings, obtained by the thermal deposition method, were included chitosan and silver ions as antimicrobial components. Spectrophotometric method was used for the measurement of the optical density of the culture suspension (540 nm wavelength) to investigate the antimicrobial activity of the samples to the microorganism *E. coli* ATCC 25922. It is shown that in terms of physiological solution, at pH = 6 and a temperature of 37°C samples exhibit a bacteriostatic action within 48 hours by Chitosan and silver ions.

УДК 619:577.1:57.08:543.066:615.372:636.085

РОЗРОБКА МЕТОДИКИ ОТРИМАННЯ КОМПОНЕНТІВ ДЛЯ ВИЯВЛЕННЯ ЗЕАРАЛЕНОНУ В КОРМАХ І ПРОДУКТАХ ТВАРИННИЦТВА З ВИКОРИСТАННЯМ ІМУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛІЗУ

Михайлова С.А., Попова О.М., Стегній Б.Т., Куцан О.Т., Коваленко Л.В.

Національний науковий центр «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини», м. Харків

У сучасному сільському господарстві проблеми, пов'язані з розповсюдженням і накопиченням біотичних і ксенобіотичних контамінантів кормів і продуктів тваринного походження, актуальні та потребують особливої уваги. Контамінація мікотоксинами об'єктів довкілля викликає накопичення їх у кормах для сільськогосподарських тварин. Згодовування недоброякісних кормів призводить до зниження резистентності організму тварин, до різноманітних захворювань, зниження продуктивності, погіршення якості продукції тваринництва [1, 2].

Основними продуцентами зеараленону є фітопатоген зернових культур *Fusarium graminearum* і *Fusarium tricinctum*. Зеараленон володіє сильною естрогенною та тератогенною дією, акумулюється у тканинах тварин. Наявність зеараленону в кормах вказує на можливу наявність інших, неідентифікованих мікотоксинів [3].

Зеараленон у кормах і продуктах тваринництва визначають методами: високоефективна тонкошарова рідинна хроматографія, імуноферментний аналіз (ІФА). Популярність ІФА пояснюється наявністю таких характеристик, як безпечність, універсальність, висока чутливість та специфічність, відтворюваність, простота проведення аналізу [3, 4, 5, 6].

Вітчизняні тест-системи ІФА для визначення мікотоксинів не розроблені, що й послугувало приводом для початку наших розробок.

Мета роботи. Розробити методику отримання компонентів ІФА: кон'югованого антигену зеараленону з бичачим сироватковим альбуміном (БСА), антитіл (АТ) до кон'югованого зеараленону з БСА, кон'югату (АТ проти зеараленону з БСА) з пероксидазою хрому.

Матеріали та методи. При виконанні досліджень використовували сухий стандарт зеараленону, бичачий сироватковий альбумін (БСА), глютаровий альдегід, 0,1 М та 0,01 М фосфатно-сольовий буфер (ФСБ), 0,1 М боратний буфер, ДЕАЕ-сефадек А-50, періодат натрію, сульфат амонію, оцтовий буфер з рН 4,0, карбонатно-бікарбонатний буфер (КББ) з рН 9,5, боргідрід натрію, пероксидазу хрому, колонки хроматографічні розміром 2,5430 см та 1430 см.

Для отримання антитіл проводили імунізацію самців кролів породи шиншилла, вагою не менше 2,5 кг. По закінченні дослідів кролів було евтаназовано з дотриманням основних принципів біоетики, після легкого медикаментозного наркозу, шляхом тотального знекровлення.

Дослідження проводили за допомогою методів: імунохімічних (кон'югація антигену зеараленону з бичачим сироватковим альбуміном і кон'югація антитіл з пероксидазою хрому, іонообмінна хроматографія), імунологічних (реакція дифузної преципітації, імунізація кролів кон'югованим антигеном мікотоксину) та біохімічних (визначення загального білка за Бредфордом). Кон'югацію отриманих антитіл із пероксидазою хрому здійснювали періодатним методом за Nakane, 1987 [5, 6].

Дослідження проводили в лабораторії клінічної біохімії та імунохімії ННЦ «ІЕКВМ».

Результати досліджень. Оскільки зеараленон має низьку молекулярну масу та не викликає утворення антитіл при парентеральному введенні до організму тварин, необхідно було провести кон'югацію його з бичачим сироватковим альбуміном [6, 7]. Для цього сухий зеараленон розчиняли в ацетоні у співвідношенні 1:2. БСА розчиняли у 0,1М КББ у співвідношенні 1:5. Розчини

зеараленону та БСА з'єднували при постійному перемішуванні. Для більшого зв'язування мікотоксину з БСА додавали глютаровий альдегід у двох концентраціях 0,2 % (I спосіб) та 1,0 % (II спосіб). Реакційну суміш інкубували (2–3) години за температури плюс 4 °С. Зеараленон, кон'югований з БСА, осаджували шляхом додавання сульфату амонію. У синтезованому кон'югованому антигені визначали вміст загального білка за Бредфордом для оцінки концентрації. Кон'югований антиген, отриманий за першим способом, містив $1,6 \pm 0,001$ мг/см³ загального білка, а отриманий за другим способом – на 50 % менше ($0,8 \pm 0,001$ мг/см³ загального білка). Тому, для подальших досліджень використовували кон'югований антиген, отриманий за першим способом. Осаджений кон'югат з концентрацією загального білка $1,6$ мг/см³ очищували від фракцій білків, не зв'язаних з зеараленоном, двома способами: діалізом проти 0,1 М боратного буферу з рН 8,2 та колоночною гель-фільтрацією. Після цього ще раз визначали вміст білка для оцінки ступеню очищення. Е зразках вміст білка складав $1,5$ мг/см³ та $1,54$ мг/см³ відповідно. З огляду на те, що рівень білка в очищених зразках незначно відрізнявся, отримані кон'югати було з'єднано в одну пробу для подальших досліджень.

Кон'югований антиген, отриманий за розробленою методикою, використали для ґрундування кролів: вводили 2 см³ кон'югованого антигену з повним ад'ювантом Фрейнда (1:1) уздовж хребта у 8 точок підшкірно.

Через 45 діб проводили гіперімуназацію за двома схемами.

1-а схема: введення внутрішньовенно кон'югованого антигену без ад'юванту у зростаючих дозах: 0,1 см³, 0,2 см³ і 0,3 см³ щодобово впродовж трьох діб.

2-а схема: введення підшкірно кон'югованого антигену без ад'юванту у зростаючих дозах: 0,1 см³, 0,2 см³ і 0,3 см³ щодобово впродовж трьох діб (рис. 1).

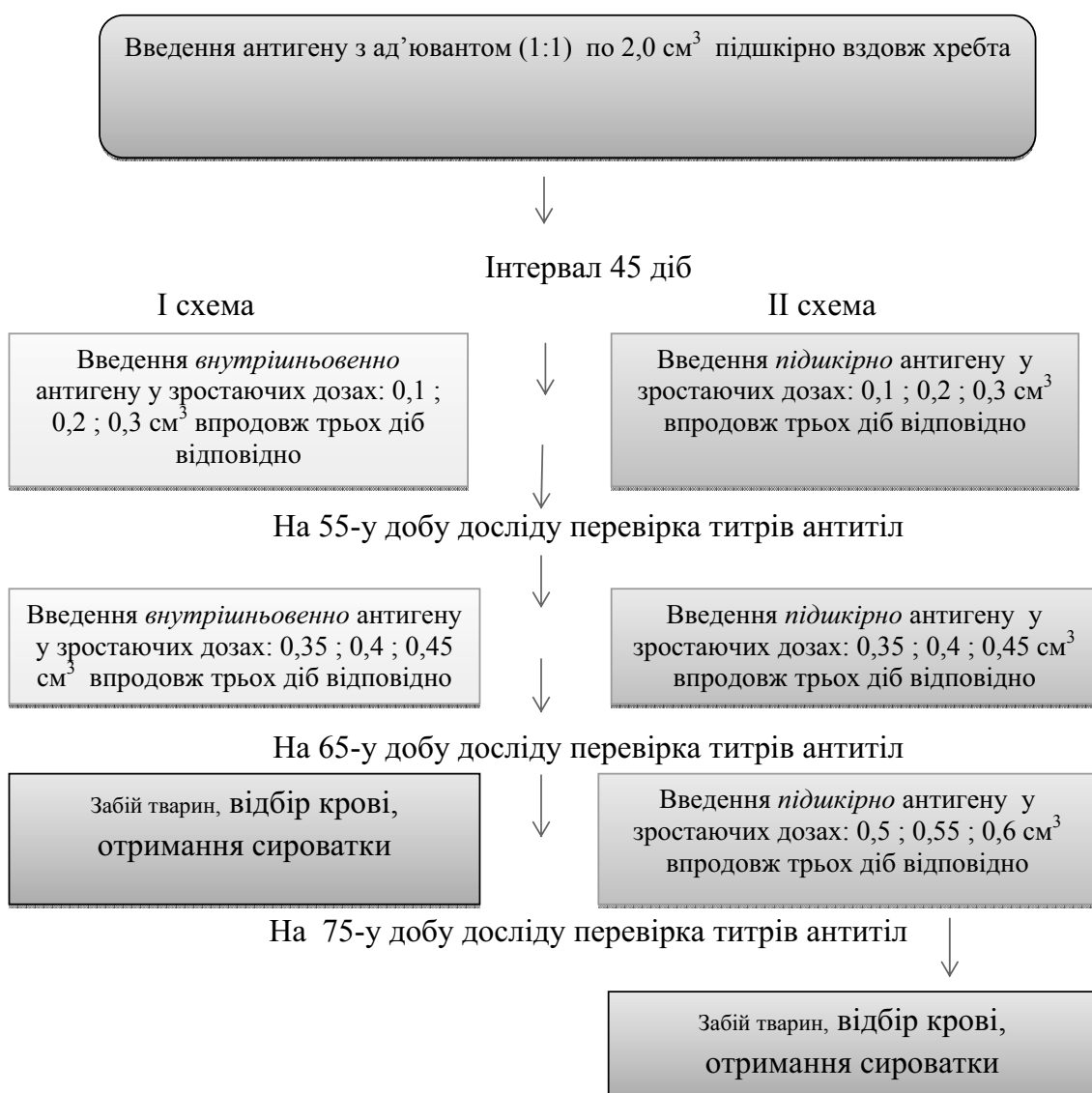


Рис. 1. Схема імунізації кролів

Титри АТ на 55, 65 та 75-у добу визначали в реакції імунодифузії в агаровому гелі. Виявлено, що рівень титру антитіл проти кон'югованого антигену на 65-у добу дослідів сягав 1:8 у кролів, імунізованих за першою схемою, та 1:4 – у кролів, імунізованих за другою схемою (рис. 2). Як видно з рисунку 2 при імунізації за другою схемою титри антитіл 1:8 з'являються лише на 75-у добу.

Виходячи з цих даних, кролів, імунізованих за першою схемою, було знекровлено на 65-у добу, імунізованих за другою схемою – на 75-у добу імунізації.

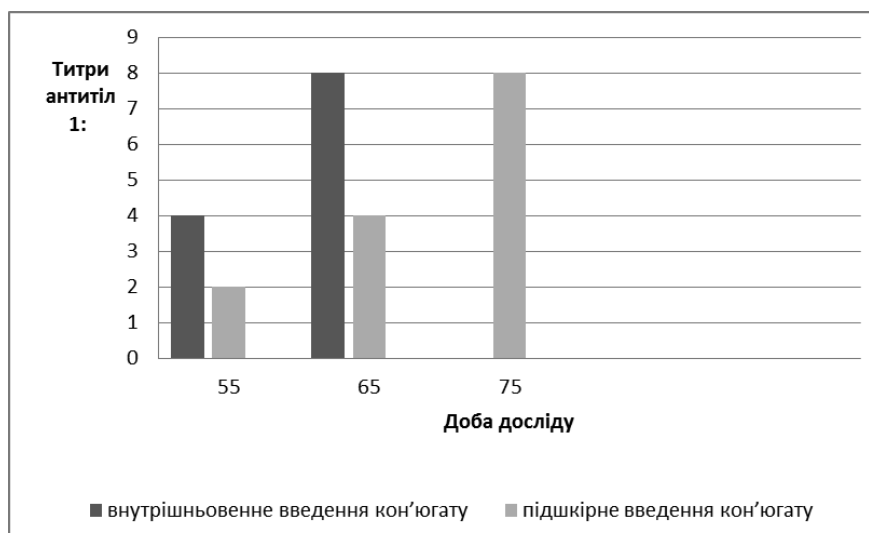


Рис. 2. Динаміка підвищення титрів антитіл проти кон'югованого антигену за різних умов введення кон'югату

У подальшому із антисироватки кролів отримували антитіла до кон'югованого антигену за допомогою іонообмінної хроматографії в 0,01 М фосфатно-сольовому буфері з рН 8,0. Отримані антитіла кон'югували з пероксидазою хрому за вищезначеною методикою.

Активність виготовленого кон'югату перевіряли за постановкою прямого варіанта ІФА.

Висновки. 1. Виявлено, що додавання глютарового альдегіду у концентрації 0,2 % забезпечує більш інтенсивне зв'язування зеараленону з БСА, ніж додавання 1 %-го глютарового альдегіду.

2. Встановлено, що кон'югат можна очищувати діалізом і колоночною гель-фільтрацією, спосіб очищення суттєво не впливає на вміст білка.

3. Встановлено, що титр АТ у сироватці крові кролів досягає рівня 1:8 за внутрішньовенного введення антигену на 65-у добу, за підшкірного введення – на 75-у добу імунізації.

Перспективи подальших досліджень. Компоненти, отримані за розробленою методикою, будуть використані у серії досліджень щодо відпрацювання протоколу постановки ІФА. Для цього будуть підібрані режими проведення реакції: рН буферних розчинів, кількісний, температурний та часовий режими адсорбції реагентів; імунна та ензимна активність, фермент-субстратні співвідношення.

Список літератури

1. Бессарабов, В.С. Методы контроля и профилактики незаразных болезней птиц [Текст] / В.С. Бессарабов. – М. : Агропромиздат, 1969. – 301 с.
2. Богданов, Г.А. Кормление сельскохозяйственных животных [Текст] / Г.А. Богданов. – М. : Агропромиздат, 1990. – 205 с.
3. Малинин, О.А. Ветеринарная токсикология [Текст] : учеб. пособие / О.А. Малинин, Г.А. Хмельницкий, А.Т. Куцан. – Корсунь-Шевченковский : ЧП Майдаченко, 2002. – 464 с.
4. Дзантиев, Б.Б. Гетерогенные методы иммуноферментного анализа [Текст] / Б.Б. Дзантиев // Бюл. ВНИИЗВ. – 1985. – Вып. 58. – С. 10–22.
5. Таранов, А.Г. Диагностические тест-системы (радиоиммунный и иммуноферментный методы диагностики) [Текст] / А.Г. Таранов. – 2-е изд., перераб. и доп. – М. : Издатель Мокеев, 2002. – 288 с.
6. Егоров, А.М. Теория и практика иммуноферментного анализа [Текст] / А.М. Егоров [и др.]. – М. : Высш. шк., 1991. – 288 с.
7. Фримель, Г. Иммунологические методы [Текст] / Г. Фримель. – М. : Медицина, 1987. – 472 с.

DEVELOPMENT THE METHOD FOR PRODUCING COMPONENTS FOR DETERMINING ZEARALENONE IN FEED AND ANIMAL PRODUCTS USING ELISA

Mikhailova S.A., Popova E.N., Stegnyy B.T., Kutsan O.T., Kovalenko L.V.

National Science Center „Institute of Experimental and Clinical Veterinary Medicine“, Kharkiv

It was developed a technique for producing components for the determination of zearalenone in feed and animal products: zearalenone conjugate with bovine serum albumin, antibodies to conjugates of zearalenone with bovine serum albumin, peroxidase conjugate with antibodies.