

УДК 615.36:577.1

СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ПОЛУЧЕНИЯ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНОГО ПРЕПАРАТА НА ОСНОВЕ ЭМБРИОНАЛЬНЫХ ТКАНЕЙ ПТИЦ

Ржепаковский И.В., Тимченко Л.Д., Писков С.И., Вакулин В.Н., Пономаренко А.П.

ФГАОУ ВПО «Северо-Кавказский федеральный университет», Ставрополь, Россия (355009, г. Ставрополь, ул. Пушкина, 1), e-mail: 78igorr@mail.ru

На основании анализа литературы выявлена необходимость разработки и совершенствования биотехнологии тканевых препаратов для ветеринарии. Выбор сырья для биотехнологического продукта, разрабатываемого для ветеринарных целей, имеет принципиальное значение, поскольку наряду с биотехнологическими потенциалами, обеспечивающими специфическую эффективность, сырьевой объект должен отвечать критериям, обуславливающим экономический эффект при производстве и применении готового продукта. В настоящее время в биотехнологии расширяется тенденция к использованию в технологических схемах эукариотических клеток, целых многоклеточных организмов или их тканей и органов. Реализован эксперимент по совершенствованию технологии получения тканевого препарата на основе эмбриональных тканей птиц, основанный на использовании технологических преимуществ метода гомогенизации под высоким давлением – *High pressure homogenization*. На основе физико-химических исследований (однородность препарата, дзета-потенциал, размер частиц, концентрация белка, дезоксирибонуклеиновой кислоты, рибонуклеиновой кислоты и характеристические спектры поглощения), в сравнении с препаратом «СТЭМБ», доказана возможность получения принципиально нового биологически активного тканевого препарата с применением в технологической схеме метода гомогенизации под высоким давлением (НПН).

Ключевые слова: биотехнология тканевых препаратов, эмбриональные ткани птиц, гомогенизация под высоким давлением, физико-химические исследования.

IMPROVEMENT OF THE TECHNOLOGY OF OBTAINING BIOLOGICALLY ACTIVE PREPARATION ON THE BASIS OF EMBRYONIC TISSUE OF BIRDS

Rzhepakovskiy I.V., Timchenko L.D., Piskov S.I., Vakulin V.N., Ponomarenko A.P.

North-Caucasian Federal University, Stavropol, Russia (355009, Stavropol, street Pushkin, 1), e-mail: 78igorr@mail.ru

Based on the analysis of the literature identified the need for development of biotechnology tissue preparations for veterinary medicine. The choice of raw materials for biotechnology product, developed for veterinary purposes, is of fundamental importance, because along with biotechnology potentials, providing specific efficiency, raw material object shall meet the criteria for determining the economic effect of the production and use of the finished product. Currently in biotechnology expanding trend in the technological schemes of eukaryotic cells, the whole multicellular organisms or their tissues and organs. Implemented an experiment to improve the technology of tissue preparation on the basis of embryonic tissue of birds, based on the use of the technological advantages of the method of homogenization under high pressure – *High pressure homogenization*. On the basis of physical and chemical research (homogeneity of the drug, zeta potential, particle size, concentration of protein, deoxyribonucleic acid, ribonucleic acid and characteristic absorption spectra), in comparison with the drug "STEMB", proved the possibility of obtaining fundamentally new biologically active tissue preparation with application in the technological scheme of the method of homogenization under high pressure (НПН).

Keywords: biotechnology tissue preparations, embryonic tissue of birds, homogenization under high pressure, physico-chemical studies.

Введение

Конец XX и начало XXI века ознаменовались бурным развитием биотехнологий. Биотехнологическим способом производят генно-инженерные белки (интерфероны, интерлейкины, инсулин, вакцины против гепатита и т.п.), ферменты, диагностические средства (тест-системы на наркотики, лекарственные вещества, гормоны и т.п.), витамины,

антибиотики, биodeградируемые пластмассы, биосовместимые материалы, биологически активные препараты и т.д. [1].

Совершенно очевидно, что в сфере производства лекарственных средств и биологически активных добавок, как для человека, так и для животных, биотехнология вытесняет традиционные технологии и открывает принципиально новые возможности.

Определяющим фрагментом биотехнологического процесса является выбор качественного и потенциально богатого биологически активными веществами сырья. При этом использование биообъектов в качестве источников сырья является на сегодняшний день одним из наиболее перспективных направлений ветеринарной фармакологии.

Не менее важными и кардинально влияющими на качество препаратов являются манипуляции с биообъектом, повышающие его активность, как в процессе жизнедеятельности, так и в процессе его непосредственной технологической переработки, к которой традиционно относят измельчение и гомогенизацию, обеспечиваемые в настоящее время различными способами. Это позволяет добиться повышения количественного и качественного уровней биологически активных веществ не только в результате управления на разных этапах онтогенеза функциональными преобразованиями в живой системе, но и за счет их высвобождения, структурирования и накопления в дисперсной системе, являющейся основой для конструирования различных препаративных форм.

Выбор сырья для биотехнологического продукта, разрабатываемого для ветеринарных целей, имеет принципиальное значение, поскольку наряду с биотехнологическими потенциальными, обеспечивающими специфическую эффективность, сырьевой объект должен отвечать критериям, обуславливающим экономический эффект при производстве и применении готового продукта.

В качестве сырьевых объектов сегодня широко распространены представители бактерий и грибов, которые используются при производстве вакцин, анатоксинов, аллергенов, антибиотических, витаминных, пробиотических препаратов, аминокислот и микро-макроэлементов. Данные препараты занимают основную долю рынка ветеринарных препаратов.

Однако в настоящее время в биотехнологии расширяется тенденция к использованию в технологических схемах эукариотических клеток, целых многоклеточных организмов или их тканей и органов. В этом направлении ведется работа по поиску удобных кандидатов на роль сырьевых источников, а также новых биотехнологий по их переработке, для получения фармакологических, в том числе ветеринарных средств нового поколения [5].

Издавна при производстве ветеринарных средств использовались субстанции животного происхождения, такие как кровь и различные органы и ткани. Эти субстанции

использованы в качестве основы в технологии тканевых препаратов по методу профессора В.П. Филатова, которые получили свое распространение, начиная с 30-х годов 20 века в СССР. Тканевые препараты вплоть до 80-х годов 20 века активно внедрялись в медицинскую практику при лечении и для профилактики различных патологий [3].

Однако, последние 30 лет использование данных средств в клинике неоправданно ограничено и представлено единичными примерами, в то же время в научном плане продолжается разработка и испытание довольно большого числа тканевых препаратов [2, 7, 8]. При этом, несмотря на получение множества положительных результатов при использовании тканевых препаратов в научных испытаниях, этим все и ограничивается, без внедрения в производство.

Скорее всего, это связано со сложностью верификации результатов испытаний, а значит, и сертификации тканевых препаратов. В качестве причины этого можно рассматривать такую особенность тканевых препаратов, как их многокомпонентный состав, что связано с использованием биологических тканей, содержащих множество биологически активных веществ. С одной стороны, биологически активные вещества в таком препарате обладают высоким терапевтическим потенциалом, а, с другой стороны, за счет их разнообразия трудно добиться однородности, которая обеспечивается только путем диспергирования.

Традиционными и доступными производству методами не всегда удается добиться желаемого моноструктурирования и стабильности дисперсной системы, что ставит под сомнение степень биодоступности и повышает риск возможных осложнений. В настоящее время для решения этих проблем существует тенденция к включению в технологический процесс методов глубокой очистки – микрофльтрация, электрофорез и т.п. с выделением отдельных действующих начал, таких как, например РНК [7].

Однако при этом очистка и выделение отдельных действующих БАВ, по нашему мнению, приводят к значительному удорожанию препаратов, а также могут снижать их активность за счет потери различных, иногда крайне ценных, сопутствующих биологически активных компонентов.

Вышеперечисленные проблемы, связанные с недостатками степени измельчения, а соответственно экстракции, диспергирования и структурирования, и, как следствие, не задействованными потенциями сырьевой биосубстанции, отчасти касаются и разработанного нами ранее тканевого препарата «СТЭМБ», получаемого на основе высокоактивного биологического сырья – эмбриональных и внеэмбриональных тканей кур на 9–10-е сутки развития [9].

По своей сути СТЭМБ представляет собой тканевой препарат, эксклюзивные свойства которого достигаются за счет комплекса манипуляций, направленных на активацию эмбрионально-яичной массы, что позволяет повысить в субстрате уровень биологически активных веществ, в том числе за счет образования биогенных стимуляторов. Следует отметить, что содержащиеся в подобных средствах «биогенные стимуляторы» оказывают влияние на основные стороны обмена веществ, что выражается в изменении обменных и энергетических процессов организма [4, 8].

Мнение исследователей на природу биогенных стимуляторов разноречиво. Предположительно, они являются неоднородной по химической структуре группой биостимулирующих веществ. Однако многие ученые сходятся во мнении, что это низкомолекулярные органические соединения, к числу которых относят, например, органические кислоты, содержащиеся в живых клетках (дикарбоновые, трикарбоновые кислоты, РНК, ДНК и т.п.) и низкомолекулярные пептиды (цитамины) [3, 6, 7].

Поэтому максимальное извлечение этих веществ из клеток, накопление их в свободном виде в конечном продукте, а также стабилизация дисперсий, является принципиальной задачей технологического процесса.

Цель работы – совершенствование технологии получения тканевого препарата на основе эмбриональных тканей птиц, с использованием преимуществ метода гомогенизации под высоким давлением – *High pressure homogenization (HPH)*.

Особенностью данного метода является высокая степень измельчения и гомогенизации тканевых и молекулярно-клеточных композитов сырьевого субстрата, что обеспечивает максимальный выход низкомолекулярных соединений в конечный продукт. По-нашему мнению, это может обеспечить его стабильность, высокую биодоступность и активность. Данный метод предполагает использование специального гомогенизатора высокого давления, способного проводить процесс при давлении до 2000 бар.

Технологической особенностью этого оборудования является наличие клапана с микроззором, на который под высоким давлением и с низкой скоростью поступает негомогенизированный продукт. Это позволяет получить частицы микро и наноразмеров в зависимости от заданных параметров гомогенизации и свойств измельчаемого субстрата. Важнейшим итогом этого процесса является получение продукта, стандартизованного по физико-химическим параметрам (дзета-потенциал, размер и молекулярная масса частиц, коллоидная и термическая стабильность, химический состав) [10].

Материалы и методы исследования

В эксперименте воспроизведены основные этапы технологического процесса получения препарата «СТЭМБ» [3] и один цикл дополнительной гомогенизации при помощи

лабораторного гомогенизатора высокого давления *APV Lab Series Homogenizers 2000* при 1900 бар.

Определены физико-химические характеристики нового варианта препарата, в том числе дзета-потенциал, размер частиц образующих препарат, общее количество белка, РНК, ДНК и спектрофотометрический профиль, в сравнении с препаратом «СТЭМБ».

Для определения дзета-потенциала и размера частиц использовался анализатор *Malvern Zetasizer Nano ZS* (Malvern, Великобритания), предоставленный научно-производственным объединением «СайТЭК» г. Ставрополь.

Для определения химического состава осуществляли:

- 1) количественную оценку содержания белков в образце методом специфической флуоресценции (флуориметр *Qubit 2.0*, Life Technologies, США);
- 2) количественную оценку содержания рибонуклеиновых кислот (РНК) в образце методом специфической флуоресценции (флуориметр *Qubit 2.0*, Life Technologies, США);
- 3) количественную оценку содержания дезоксирибонуклеиновых кислот (ДНК) в образце методом специфической флуоресценции (флуориметр *Qubit 2.0*, Life Technologies, США);
- 4) оценку характеристических спектров поглощения исследуемых образцов в диапазоне длин волн 190–840 нм (спектрофотометр *NanoDrop 2000C*, Thermo Fisher Scientific, США).

Результаты исследований

Биологически активный препарат, полученный с использованием гомогенизатора высокого давления, по сравнению с препаратом «СТЭМБ» приобрел признаки большей физической устойчивости. Кроме того, выявлено, что большинство частиц в препарате имеют диаметр ниже 100 nm и таким образом относятся к низкомолекулярным соединениям. Так, при применении *HPH* достоверно увеличилось количество общего белка, ДНК и в особенности РНК, соответственно на 71 мкг/мл (на 27,3 %), 0,34 мкг/мл (на 9,7 %) и 13,2 мкг/мл (на 194,1 %), что свидетельствует о более качественном разрушении клеточных структур и выходе в раствор биологически активных действующих веществ, обуславливающих биологическую активность препарата. Кроме того, расширение диапазона характеристических спектров вправо свидетельствует о качественном увеличении перечня БАВ в препарате, полученном с использованием *HPH* (табл. 1).

Таблица 1. Физико-химические свойства тканевого препарата, полученного с использованием *HPH*

Наименование показателя	Характеристика препарата «СТЭМБ» (контроль)	Характеристика препарата полученного с использованием <i>HPH</i>
Внешний вид	опалесцирующая жидкость желтоватого цвета с белым хлопьевидным осадком.	опалесцирующая жидкость желтоватого цвета с небольшим количеством мелкозернистого осадка.

Однородность препарата	при встряхивании образуется взвесь быстро выпадающая в осадок.	при встряхивании образуется однородная устойчивая взвесь.
Дзета-потенциал	минус 8,01 mV	минус 8,20 mV
Размер частиц (средний диаметр, nm - количество, %)	35,13 d nm – 5,2 % 258,5 d nm – 80 % 2278 d nm – 14,7 %	27,92 d nm – 12,0 % 82,31 d nm – 55 % 623,8 d nm – 32,9 %
Общая концентрация белка, мкг/мл	260,0	331,0
Общая концентрация ДНК, мкг/мл	3,490	3,830
Общая концентрация РНК, мкг/мл	6,80	20,00
Характеристический спектр поглощения в диапазоне длин волн 190–840 нм	max 219 nm, 229 nm	max 215 nm, 228 nm, 275 nm

Заключение

Изменения в физико-химических параметрах неопровержимо свидетельствуют о том, что, несмотря на использование в обеих технологических схемах одной субстанции эмбрионального происхождения, применение технологии *HPH* обеспечивает получение качественно нового тканевого препарата.

Исследование проведено при финансовой поддержке Минобрнауки России, в рамках выполнения базовой части государственного задания (2014/2016).

Список литературы

1. Васильев Р.Г. Перспективы развития современной медицинской биотехнологии // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова. – 2011. – Т. 7, № 4. – С. 13-17.
2. Девришов Д.А., Жарова Т.П. Иммуномодулирующие свойства «Бурсина» // Ветеринарная медицина. – 2009. – № 1-2. – С. 32-34.
3. Рейдл К.А. Эффективность влияния некоторых тканевых препаратов на рост, развитие, резистентность и раневой процесс у поросят подсосного периода: дис. ... д-ра ветерин. наук. – Тарту, 1986. – С. 14-62.
4. Ржепаковский И.В., Тимченко Л.Д., Вакулин В.Н., Ржепаковский В.В. Экспериментальное обоснование технологии приготовления препарата «СТЭМБ» // Вестник Московского государственного областного университета. Серия: Естественные науки. – 2010. – № 1. – С. 56-60.

5. Санин А.В., Наровлянский А.Н., Пронин А.В. Иммуномодуляторы в сельском хозяйстве – дань моде или необходимость // Российский ветеринарный журнал. – 2011. – №1. – С 37-40.
6. Серебряная Н.Б., Новик А.А. ДНК как иммуностимулятор (обзор литературы) // Медицинская иммунология. – 2001. – № 1. – С. 27-34.
7. Сизов А.А. Исследование свойств экстрактов и компонентов эмбриональных тканей птиц раннего срока развития и получение на их основе ветеринарного препарата иммуностимулирующего действия: дис. ... канд. биол. наук. – Новосибирск, 1996. – 116 с.
8. Тимченко Л.Д., Ржепаковский И.В., Арешидзе Д.А. Перспективы использования биологически активных препаратов на основе экстрактов эмбриональных тканей кур // Вестник Московского государственного областного университета. Серия: Естественные науки. – 2009. – № 2. – С. 94-97.
9. Тимченко Л.Д., Ржепаковский И.В., Михайленко В.В. и др. Способ приготовления биостимулятора эмбрионального // Патент России № 2197251, 2003, Бюл. № 3.
10. Barnadas-Rodríguez R., Sabés M. Factors involved in the production of liposomes with a high-pressure homogenizer // International journal of pharmaceutics. – 2001. – V. 213, № 1-2. – P. 175-186.

Рецензенты:

Жарникова И.В., д.б.н., старший научный сотрудник, ведущий научный сотрудник научно-производственной лабораторией препаратов для диагностики особо опасных и других инфекций ФГУЗ «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, г. Ставрополь.

Таран Т.В., д.м.н., старший научный сотрудник, заведующая лабораторией питательных сред для культивирования микроорганизмов 1–4 групп патогенности ФГУЗ «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, г. Ставрополь.