

**Министерство здравоохранения Российской Федерации**  
**Федеральное государственное учреждение науки**  
**Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт**

**На правах рукописи**

**Грядских Диана Анатольевна**

**Синтез композиционных аффинных сорбентов с  
магнитными свойствами и их технологическое  
использование при изготовлении чумных  
иммунобиологических препаратов**

**специальность 03.00.23 – биотехнология**

**ДИССЕРТАЦИЯ**  
**на соискание ученой степени кандидата биологических наук**

*Научный руководитель:*  
**доктор медицинских наук,**  
**профессор Тюменцева И.С.**

**Ставрополь - 2004**

**ВВЕДЕНИЕ**

**ГЛАВА 1. Обзор литературы**

- 1.1. Синтез и исследование магнитосорбционных органокремнеземных материалов с иммобилизованными биологически активными лигандами.....
- 1.2. Строение и свойства хитозана, как перспективного компонента для синтеза композиционных сорбентов, и медико-биологические аспекты его применения
- 1.3. Культивирование микроорганизмов с применением методов их иммобилизации на сорбентах
- 1.4. Применение магнитных иммуносорбентов для диагностики особо опасных инфекционных заболеваний и индикации их возбудителей

**ГЛАВА 2. Материалы и методы**

- 2.1 Характеристики используемых штаммов микроорганизмов
- 2.2. Характеристика лабораторных животных
- 2.3.Способы получения антигенов чумы, выделения специфических иммуноглобулинов, получения иммунопероксидазных конъюгатов и их контроль
- 2.4. Материалы для синтеза композиционных кремнеземных сорбентов и физико-химические методы их исследования
  - 2.4.1. Химический анализ элементоксидных слоев сорбентов
  - 2.4.2. Физико-химические методы исследования
- 2.5. Сублимация биопрепаратов
- 2.6. Статистическая обработка результатов исследования

### **ГЛАВА 3. Синтез композиционных магноиммуносорбентов и исследование их свойств**

- 3.1. Синтез хитозанкремнеземных и элементосодержащих композиционных магносорбентов
- 3.2. Химическое модифицирование поверхности композиционных магносорбентов функциональными группами
- 3.3. Получение магноиммуносорбентов и иммобилизация специфических иммуноглобулинов на поверхности сорбента

### **ГЛАВА 4. Использование магнитоуправляемых иммобилизованных систем для глубинного культивирования вакцинного штамма чумного микроба**

- 4.1. Глубинное культивирование чумного микроба, иммобилизованного на магнитных носителях
- 4.2. Изучение свойств чумной живой сухой вакцины, выращенной с помощью иммобилизованного инокулята
- 4.3. Получение капсульного антигена (Ф1) чумного микроба

### **ГЛАВА 5. Иммуноферментные тест-системы для диагностики чумы и индикации ее возбудителя**

**Заключение**

**Выводы**

**Список использованных источников**

**Приложения**

## Перечень сокращений

Аг	- антиген
Ат	- антитело
БСА	- бычий сывороточный альбумин
ДЭО	- деструкционно-эпитаксиальное осаждение
ЗФР	- забуференный физиологический раствор
ИФА	- иммуноферментный анализ
Ig	- иммуноглобулины
КИФА	- количественный иммуноферментный анализ
КМИС	- композиционные магноиммуносорбенты
КМС	- композиционные магносорбенты
МИС	- магноиммуносорбент
МКА	- моноклональные антитела
МС	- магносорбент
НРИФ	- реакция непрямой иммунофлуоресценции
ПЦР	- полимеразная цепная реакция
ПЭГ	- полиэтиленгликоль
РНГА	- реакция непрямой гемагглютинации
РА	- реакция агглютинации
РИА	- радиоиммунный анализ
РИД	- реакция иммунодиффузии
РИФ	- реакция иммунофлуоресценции
ФС	- фармакопейная статья
ФСБ	- фосфатно-солевой буфер
ФХКС	- феррохитозанкремнеземный сорбент
ХЛИА	- хемилюминесцентный иммунный анализ
ХКС	- хитозанкремнеземный сорбент
ЭФСП	- электрофорез в свободном потоке

## **ГЛАВА 1. Обзор литературы**

### **1.1. Синтез и исследования магнитосорбционных органокремнеземных материалов с иммобилизованными биологически активными лигандами**

Контакт различных биообъектов окружающего мира с кремнеземами, его активное участие в жизненных процессах обосновывают определенный интерес для применения различных видов кремнеземов в биологии, медицине, сельском хозяйстве, биотехнологии (М.Г. Воронков, Г.И. Зельчан, Э.Я. Луковец, 1978; Р. Айлер, 1982; Г.Д. Лисичкин, 1989; А.В. Брыкалов, 1991; А.В. Брыкалов, 1993; А.В. Брыкалов, И.В. Жарникова, И.С. Тюменцева, 1995).

Медико-биологические аспекты применения кремнеземов в качестве сорбентов с широким спектром действия, носителей для конструирования твердофазных диагностических тест-систем выдвигают задачи по детальному изучению химии их поверхности для выявления наиболее существенных факторов, которые определяют особенности иммобилизации биологических объектов на поверхности и влияют на их активность, а также поиска путей целенаправленного модифицирования полезных функций кремнеземов. С целью понимания характера взаимодействия поверхности сорбентов с активными биологическими веществами: антителами, антигенами, лекарственными препаратами, элементами крови, продуктами метаболизма, микроорганизмами необходима достоверная информация о строении поверхностного слоя кремнезема, его гидроксильных группах, природе активных центров поверхности, механизмах адсорбционных и хемосорбционных процессов, эффектах структурной перестройки их поверхности при внешних воздействиях.

В биотехнологии для получения иммобилизованных биологически активных веществ широко применяются различные виды кремнеземов, которые по сравнению с органическими носителями имеют известные преимущества (В.Б. Алесковский, 1976; В.Б. Алесковский, 1978; Г.Д. Лисичкин, 1989; Ф.Ходж, 1989).

Силикагель, аэросил, пористые стекла и силохромы относятся к сорбентам на основе кремнеземов.

Силикагель является продуктом поликонденсации ортокремневой кислоты, которая образуется из силиката натрия при его обработке водными растворами кислот (С.И. Кольцов, В.Б. Алесковский, 1953). Силикагель также получают в процессе гидролиза эфиров кремневой кислоты (В.Г.Березкин, В.П. Похомов, К.И. Сакадынский, 1975). С целью увеличения размера пор в структуре силикагеля его подвергают гидротермальной обработке в автоклаве при различных температурах и давлении водяного пара. Удельная поверхность и размеры частиц получаемых силикагелей зависят от рН, температуры, концентрации реагентов, режимов сушки и условий термической обработки. Силикагель имеет глобулярную структуру (А.П. Карнаухов, 1971) и таким образом представляет собой комплекс сферических частиц, от размера и плотности, упаковки которых зависит величина его удельной поверхности, объема пор и их размеров.

Аэросил – пирогенная форма двуокиси кремния. Его получают в результате высокотемпературного парофазного гидролиза четыреххлористого кремния в токе кислорода, с последующей конденсацией в парах воды (Н.К.Бебрис, А.В. Киселев, Ю.С. Никитин, 1967). Методом ядерного магнитного резонанса показано, что объемная фаза аэросила представлена в равной степени структурными мотивами кварца и кристобалита (Г.Д. Лисичкин, 1989).

Наибольшей химической однородностью с силикагелем, аэросилами обладают аэросилогели, получаемые спеканием частиц непористого высокодисперсного диоксида кремния – аэросила (А.В. Киселев, В.М. Лукьянович, Ю.С. Никитин, 1969; А.В. Киселев, В.И. Лыгин, 1972; Г.Д.Лисичкин, 1989.). Данные сорбенты имеют достаточно крупные поры. Проводя их термообработку, добиваются получения сорбентов с узким распределением пор по размерам.

В работе (К. Оккерс, 1973) представлены данные исследований непористого кремнезема – полисорба, глобулы которого, по мнению авторов, – это мелкие сферические частицы. По данным совмещенного ИК - спектрального и гравиметрического анализа, сделан вывод о преобладании на поверхности полисорба изолированных гидроксильных групп, сравнительно равномерно расположенных на расстоянии 0,6–0,7 нм.

Пористые стекла – особая форма аморфного кремнезема. Образование пористых стекол является следствием химических и структурных превращений, происходящих в силикатных стеклах при взаимодействии с растворами кислот (В.М. Коликов, Б.В. Мчедлишвили, 1988). В результате выщелачивания щелочносиликатных стекол по такому механизму в продуктах образуются полости, размеры которых сопоставимы с размерами катионов, присутствующих в исходном стекле, а общий объем таких полостей находится в прямой зависимости от содержания щелочного оксида в стекле.

В работе авторов (И.К. Бебрис, А.В. Киселев, Ю.С. Никитин, 1967) предложен способ получения синтетических макропористых кремнеземов – силохромонов, представляющих собой продукты гелеобразования водных суспензий аэросила. Данные адсорбенты без дополнительной гидротермальной обработки имеют крупные поры, однако распределение пор по размерам у них весьма широкое и с целью получения на их основе адсорбентов с узким распределением пор проводят термообработку при 1073– 1137 К. Поскольку силохромы, выпускаемые отечественной промышленностью, имеют развитую поверхность и размеры пор, которые достаточны для проникновения большинства биополимеров, то это и определяет целесообразность синтеза на их основе адсорбентов для аффинной хроматографии, носителей для твердофазных тест-систем.

Таким образом, широкий набор кремнеземов с регулируемыми структурными характеристиками позволяет подобрать материал для адсорбционных процессов, обеспечивающий оптимальную площадь контакта адсорбента с разделяемыми компонентами. Применяя однородномакропористые кремне-

земы, можно достичь одинаковой степени взаимодействия молекул сорбата со всей поверхностью адсорбента.

Для выяснения особенностей поверхностной структуры кремнезёмов проведено большое число исследований (С.И. Кольцов, 1965; И.К. Бебрис, А.В. Киселев, Ю.С. Никитин, 1967; Б.Н. Ласкорин, В.В. Стрелко, Д.Н. Стражеско и др., 1977), что дало возможность получить ответы на важные вопросы, связанные со строением гидроксильных групп кремнезёмов (А.В. Киселев, В.И. Лыгин, 1972; Б.Н. Ласкорин, В.В. Стрелко, Д.Н. Стражеско и др., 1977), их распределением (А.В. Киселев, В.И. Лыгин, 1972; В.А. Тертых, В.В. Павлов, И.К. Ткаченко, 1975) и активностью (С.И. Кольцов, 1965; А.В. Киселев, В.И. Лыгин, 1972; В.А. Тертых, В.В. Павлов, И.К. Ткаченко, 1975; Б.Н. Ласкорин, В.В. Стрелко, Д.Н. Стражеско и др., 1977). На поверхности кремнезёма в различных соотношениях может находиться 5 видов групп: 1) свободные, отдельно стоящие – ОН группы; 2) физически связанная вода – молекулы воды, имеющие водородные связи с силанольными группами; 3) дегидратированные оксиды – силоксановые группы; 4) геминальные гидроксилы, связанные с одним атомом кремния; 5) вицинальные гидроксильные группы, связанные друг с другом водородной связью (Ю.П. Айлер, Е.В. Макарова, 1976).

Научно-практический интерес к изучению поверхностного слоя кремнезёмов объясняется тем, что гидроксильные группы способны вступать в различные химические реакции, которые позволяют регулировать химическую природу поверхностных атомов, что приводит к получению адсорбентов заданного состава и строения.

Химические реакции на поверхности кремнезёмов широко применяются для синтеза модифицированных адсорбентов.

В настоящее время на поверхности кремнезёмов осуществлено большое число химических превращений, которые предложено разделить по механизму на два класса.



Выделяют большую группу реакций, относящихся к первому классу, протекающих с процессом замещения протона поверхностной силанольной группы такими электрофильными реагентами, как хлоралкоксисиланы, элементоорганические соединения, галогениды металлов. На основании экспериментальных исследований воздействия различных алкилхлорсиланов с кремнеземом (С.И. Кольцов, Г.Н. Кузнецова, В.Б. Алесковский, 1967) установлено, что реакционная способность гидроксильных групп в реакциях электрофильного замещения протона определяется эффективным положительным зарядом на центральном атоме атакующей молекулы, а также величиной нуклеофильного содействия со стороны уходящей группы.

Ко второму классу реакций с поверхностью кремнеземов относятся реакции нуклеофильного замещения гидроксильных групп и реакции нуклеофильного присоединения при расщеплении связи у поверхностного кремния анионами галогенидов и спиртами. Как указано в работах (А.В. Киселев, В.И. Лыгин, 1972; В.А. Тертых, В.В. Павлов, К.И. Ткаченко, 1975), механизм нуклеофильного замещения включает стадию образования промежуточного циклического комплекса, последующее перераспределение связей в котором приводит к конечному продукту реакции. По мнению авторов (В.В. Стрелко, В.А. Каниболицкий, 1971), образование промежуточного комплекса энергетически выгодно, так как сводит к минимуму пространственное разделение зарядов при вытеснении уходящей группы.

Существуют химические реакции на поверхности кремнеземов, начальная стадия которых протекает по механизму электрофильного замещения протона в силанольной группе, а затем образующиеся соединения претерпевают перегруппировки, соответствующие процессу нуклеофильного замещения у атома кремния. К таким реакциям относят взаимодействие дисперсных кремнеземов с хлористым тиоилом (В.В. Павлов, В.А. Тертых, А.А. Чуйко, 1976).

При взаимодействии гидроксильных групп с алкоксисиланами возможно протекание реакции конденсации с выделением спирта. Эксперименталь-

но подтверждено (А.А. Чуйко, Г.С. Павлик, 1963; W. Hertl, 1968) по исследованию кинетики и механизма реакции моно-, ди- и триметоксисиланов (W. Hertl, 1968),  $\gamma$ -аминопропилтриэтоксисилана (В.А. Тертых, А.А. Чуйко, И.Е. Неймарк, 1965; И.Е. Неймарк, 1982) с кремнеземной поверхностью методом ИК-спектроскопии. Взаимодействие  $\gamma$ -аминопропилтриэтоксисилана с поверхностью кремнезема в значительной мере зависит от условий среды, температуры реакции и структурных особенностей кремнеземного адсорбента. В работе (W.D. Vascom, R.V. Timons, 1972) было установлено, что адсорбированная поверхностью кремнезема вода (А.А.Чуйко, В.А. Тертых, Г.Е. Павлик, 1965; В.А. Тертых, А.А. Чуйко, А.А. Агзамходжаев, 1968; W.D. Vascom, R.V. Timons, 1972) способствует ускорению гидролиза молекул алкоксисиланов, значительно усложняет процесс протекания реакции и приводит к полимеризации алкоксисиланов. В неводных растворах  $\gamma$ -аминопропилтриэтоксисилана, а также при обработке его парами аэросила при 373–398 К в основном осуществляется химическая реакция с участием гидроксильных групп кремнезема.

Аминокремнеземы являются промежуточными продуктами для синтеза биоспецифических адсорбентов методом химической сборки. Для химического превращения аминогрупп, находящихся в поверхностном слое кремнезема, в альдегидные носители обрабатывают глутаровым альдегидом (С.В. Рогожин, В.Ю. Варламов, Д.Г. Вальковский, 1975).

Данный способ основан на способности аминогрупп образовывать с карбонильными соединениями азометиновые связи и отличается простотой. Однако, поскольку глутарового альдегида практически не существует в мономерном виде (P.I. Robinson, P. Dunmill, 1971; P. Monson, 1978), это приводит к неконтролируемости и ненаправленности синтеза в поверхностном слое кремнезема. Имеющиеся в составе адсорбента альдегидные группы способны вступать в химическую реакцию с аминогруппами селективных лигандов, макромолекул биополимеров, ферментов (Н.М. Самошин, Л.Т. Мотина, Л.И. Мерещенко, 1978; А.П. Синицин, А.И. Клибанов, 1978).

Для синтеза поверхностных карбоксильных групп аминоксодержащие кремнеземы обычно модифицируют ангидридами кислот (Р.А. Жакот, А.С. Корсакевич, 1977; А.П. Синицин, А.И. Клибанов, 1978).

Для активации аминоксодержащих носителей используются производные галоидалкилов. Введенный на поверхность адсорбентов галоидалкил способен алкилировать молекулы белков по аминоксодержащим, имидазольному кольцу, фенильному гидроксилу и сульфгидрильным группам (В. Ульянсон, 1978). К такому же типу химического модифицирования аминоксодержащих кремнеземов следует отнести активирование их хлористым циануром (В.В. Янишпольский, В.А. Тертых, А.А. Чуйко, 1977; А.В. Богатский, Т.И. Доведенко, А.В. Чуенко, 1979).

Широкие синтетические возможности представляет использование кремнеземов, модифицированных эпоксидами. Сорбенты, полученные обработкой кремнезема  $\beta$  – глицидоксипропилтриалкокисиланами с последующей реакцией, способны раскрывать эпоксицикл. Эпоксицикл на поверхности кремнеземов в слабокислой среде легко превращается в гликоль. Этот сорбент и его производные находят широкое применение в хроматографии биополимеров в связи с отсутствием неспецифической адсорбции белков (Г.Д. Лисичкин, 1989).

К достоинствам метода ковалентного связывания кремнийорганических соединений на поверхности кремнеземов относится возможность получения полифункциональных соединений. Наиболее часто необходимость в таких адсорбентах возникает при выделении биополимеров, когда применение только одного варианта разделения (например, обращенофазового или ионообменного) не позволяет достичь требуемой селективности. Для решения поставленной задачи поверхность носителей модифицируют смесью кремнийорганических соединений и варьированием количества исходных компонентов, чем добиваются оптимальных вкладов «гидрофобного» и ионообменного взаимодействия в процессе разделения белков. Альтернативным способом варьирования вклада «гидрофобных» и ионообменных взаимодействий в хро-

матографическом разделении является изменение длины углеродной цепи носителя. Данный метод характеризуется большой воспроизводимостью, однако, необходимость специально синтезировать набор кремнийорганических модификаторов ограничивается его применением (Г.Д. Лисичкин, 1989).

Перспективным методом, позволяющим направлено изменять реакционную способность поверхности адсорбентов и получать материалы с заданными химическим составом и строением, является метод молекулярного наслаивания (В.Б. Алесковский, 1976; А.А. Малыгин, 1986). Молекулярное наслаивание было проведено для целого ряда веществ, в том числе с хлоридами германия, олова, алюминия, циркония, железа, фосфора, оксихлоридами ванадия и хрома (В.И. Ковальков, Е.П. Смирнов, С.И. Кольцов, 1976; А.А. Малыгин, 1979; А.М. Поснова, В.Н. Пак, С.И. Кольцов, 1981).

Методом молекулярного наслаивания достигнуты возможности регулирования физико-химических свойств твердых веществ, таких как кислотность (С.И. Кольцов, В.М. Смирнов, В.Б. Алесковский, 1970; В.Н. Пак, С.И. Кольцов, В.Б. Алесковский, 1976), каталитическая активность (С.И. Кольцов, В.М. Смирнов, В.Б. Алесковский, 1970; С.И. Кольцов, В.М. Смирнов, В.Б. Алесковский, 1973), изменение реакционной способности привитых функциональных органических групп (В.Н. Паснов, 1983), селективность биоспецифических сорбентов и активность ферментов в иммобилизованном состоянии (В.Н. Паснов, 1983).

Для практических целей медицины, биотехнологии важное значение в настоящее время приобретают композиционные сорбенты, содержащие в качестве основного компонента кремнезем. В работе (А.В. Брыкалов, 1993) предложено классифицировать данные сорбционные материалы на четыре группы.

Первая группа включает способы получения сорбентов, основанные на адсорбции или хемосорбции полимеров из растворов на поверхности кремнеземов, имеющих определенные структурные характеристики (Н.Т. Брык, 1981).

Вторая группа включает способы получения сорбентов, заключающиеся в радикальной или ионной полимеризации мономеров в присутствии кремнеземного носителя (Г.В. Кудрявцев, С.М. Староверов, 1989).

Третье направление основано на поликонденсации кремнийорганических соединений с целью получения объемномодифицированных композиционных сорбционных материалов (В.Б. Алесковский, А.Я. Юффа, 1989; Ф. Ходж, 1989).

Четвертое направление основано на получении композиционных сорбентов химической сборкой структурных единиц методом формирования пористой структуры кремнеземной матрицы в присутствии полимеров и высоко-селективных лигандов (А.В. Брыкалов, 1993).

Достоинство первого способа заключается в его простоте, однако, возникает сложность с регулированием толщины полимерного покрытия и, кроме того, подобные сорбенты отличаются нестабильностью при многократном использовании, поскольку возможна десорбция полимера с поверхности кремнезема. К недостаткам композиционных сорбентов, получаемых методом прививочной полимеризации, нужно отнести нестандартность их состава и физико-химических свойств, в связи с тем, что как линейные и разветвленные макромолекулы, так и трехмерные частицы сшитого геля способны адсорбироваться на поверхности кремнезема во время синтеза.

Четвертое направление синтеза композиционных сорбентов позволяет направленно создавать заданную геометрическую структуру сорбента, а также осуществить активирование поверхности модификатором органической природы. В результате исследований (А.В. Брыкалов, 1991; А.В. Брыкалов, И.В. Жарникова, И.С. Тюменцева, 1995; А.В. Брыкалов, О.В. Воробьева, 1996; А.В. Брыкалов, О.В. Воробьева, В.Д. Пасечников, 1996) получены стандартные по составу и структуре высокостабильные сорбенты, специфичные для ряда биологически активных веществ (лизоцим, хорионический гонадотропин, гемоглобин). Данные материалы эффективны для иммобилизации ферментов, применяемых в биотехнологии, медицине, пищевой промышленности (А.В. Бры-

калов, И.В. Жарникова, И.С. Тюменцева, 1995; А.В. Брыкалов, О.В. Воробьева, 1996; А.В. Брыкалов, О.В. Воробьева, В.Д. Пасечников, 1996).

Ниже приведены примеры конкретных исследований по разработке и применению композиционных сорбентов по четырем указанным направлениям.

Для получения носителей при конструировании диагностических тест-систем известны разработанные технологии, в основе которых синтез композиционных сорбентов, содержащих в качестве биосовместимых полимеров декстран, поливиниловый спирт, N – поливинилпирролидон.

Перспективным биосовместимым полимером в составе композиционных сорбентов является хитозан. Медицинские аспекты применения препаратов на основе хитозана связаны с биологическими свойствами данного биополимера, имеющего природное происхождение и известную химическую структуру. Он биосовместим и биоразрушаем до обычных для организма веществ (N – ацетилглюкозамин или глюкозамин), обладает иммуномодулирующим, адьювантным, противомикробным, фунгистатическим, противоопухолевым, радиозащитным, противовоспалительным, ранозаживляющим, антихолестерическим, гемостатическим действием и при этом обладает малой токсичностью (К.Д. Жогелев, 2000; К.Д. Жогелев, В.Ю. Никитин, В.Н. Цыган, 2001).

Хитозан – полностью дезацетилованный продукт – поли [(1-4) – 2 – амино – 2 – дезокси – –Д – глюкозы]. Обычно полного дезацетилирования не достигается, и в состав хитозана входит небольшое количество N – ацетилглюкозамидных звеньев.

Методом ИК– спектроскопии установлено, что в процессе образования хитозана уменьшается интенсивность полос поглощения карбонила ( $1625\text{см}^{-1}$ ) амидной группы ( $3265$  и  $31100\text{ см}^{-1}$ ) и нарастает интенсивность полос при  $3365$  и  $3445\text{ см}^{-1}$ , что свидетельствует о появлении  $\text{NH}_2$  – группы (К.Д. Жогелев, 2000). Рентгеновские исследования хитозана показывают, что и он имеет ту же кристаллическую решетку, что и хитин, но меньшую упо-

рядоченность макромолекул. Хитозан, регенерированный в виде пленки в солевой или основной форме, имеет рентгенограмму, характерную для аморфных веществ.

Хитозан, в отличие от хитина, растворим в разбавленных растворах кислот, из которых он может быть выделен без изменения. Следовательно, хитозан может быть охарактеризован по вязкости и полидисперсности. В работе (К.Д. Жогелев, 2000) показано, что раствор солянокислого хитозана обладает структурной вязкостью. Также с помощью рентгеноструктурного анализа исследованы некоторые соли хитозана неорганических и органических кислот. Установлено, что молекула хитозана принимает двух-, либо восьми-складчатые спиральные конформации в зависимости от кислот. Соли, в которых цепь хитозана присутствует в виде двухскладчатой спирали, образуются кислотами -  $\text{HBr}$ ,  $\text{HI}$ ,  $\text{HNO}_3$ , D- и L-аскорбиновыми кислотами. Восьми-складчатые спирали полимера образуются с  $\text{HF}$ ,  $\text{HCl}$ ,  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{CH}_3\text{COOH}$ .

Исследования конформационного поведения кристаллического хитозана в виде ацетатной соли свидетельствуют о существовании четырех гидратированных и одной безводной форм (А. Yamamoto, I. Kawada, T. Yui, K. Ogawa, 1997).

Аминная группа сообщает хитозану полиэлектролитные свойства. При исследовании хитозана с молекулярной массой  $M_w=200000$  (согласно данным светорассеяния), степень дезацетилирования 0,8 и степень кристалличности 75% (Г.М. Тюпенко, Е.Е. Скорикова, А.Б. Зенин, 2001), установлено, что благодаря большому количеству аминогрупп в его макромолекулах, хитозан хорошо растворим в водных растворах разбавленных кислот, в которых ведет себя как типичный поликатион. Подобно другим поликатионам способен взаимодействовать с отрицательно заряженными полианионами, образуя интерполиэлектролитные комплексы (Г.М. Тюпенко, Е.Е. Скорикова, А.Б. Зенин, 2001). Интерполиэлектролитные реакции между противоположно заряженными полиионами в водных растворах являются кооперативными и полностью обратимы.

Выделены два типа участков в комплексах: упорядоченные участки, образованные противоположно заряженными звеньями обоих полиэлектролитов, связанных друг с другом (А), которые чередуются с дефектами или петлями, образованными последовательностями разобщенных звеньев полиэлектролитов (В). Благодаря наличию гидрофильных звеньев в дефектных участках (В), интерполиэлектролитные комплексы набухают в воде. Гидрофобные упорядоченные участки (А) ограничивают способность к набуханию и обуславливают их нерастворимость в воде.

Все свойства интерполиэлектролитных комплексов также присущи комплексам на основе хитозана (Г.М. Тюпенко, Е.Е. Скорикова, А.Б. Зенин, 2001; К. Ogawa, Ibukai, 1987). По данным авторов (Г.М. Тюпенко, Е.Е. Скорикова, А.Б. Зенин, 2001), комплекс хитозана и полиакриловой кислоты устойчив в водных средах в интервале рН 5-8, хорошо набухает в воде, образуя гидрогели, которые используются в качестве тромборезистентных материалов. В водных средах гидрогели сохраняют высокую механическую прочность, стабильность, эластичность, поэтому мембраны, полученные из них, не нуждаются в дополнительном упрочнении средствами химической и физической модификации.

Наличие в структурных звеньях хитозана двух гидроксильных и первичной аминогруппы расширяет возможности его модификации. Особый интерес при синтезе производных хитозана представляет получение направленных замещенных соединений (синтез О – или N – производных).

В работе Е.А.Плиско и др. (Е.А. Плиско, Л.А. Нудьга, С.Н. Данилов, 1977) проведено сульфирование хитозана смесью серного и сернистого ангидридов при температуре кипения смеси. Полученный эфир содержал 14,8% серы и обладал антикоагуляционной активностью. Для получения N – сульфохитозана, содержащего одну сульфаматную группу на каждую глюкозаминную единицу, использовали пиридин – серный ангидрид в водно – щелочной среде при рН 9-10. При последующей обработке N – сульфохитозана смесью сернистого и серного ангидрида на холоду было произведено О–



сульфирование (замещалось 75% гидроксильных групп). По результатам исследований установлено отсутствие антикоагуляционного действия у N-производного и высокая активность у O, N – производного хитозана.

Ацетилирование хитозана осуществляли уксусным ангидридом (А.В. Ильин, В.П. Варламов, 2001). Были получены образцы с различной степенью ацетилирования. Показано, что с увеличением степени ацетилирования характеристическая и динамическая вязкость уменьшаются на 40% и 66% соответственно. Конформация молекулы, а следовательно, и характеристическая вязкость заметно зависят от ионной силы и величины рН раствора. При данной ионной силе и кислых значениях рН раствора вытянутость молекулы увеличивается с возрастанием степени ацетилирования, что обусловлено тенденцией к образованию водородных связей между ОН- группой в шестом положении одного гексозного звена с карбонилем в ацетамидной группе соседнего звена. Растворимость образцов хитозана при значении рН, близких к нейтральным (рН 5-8), увеличивается с возрастанием степени ацетилирования (А.В. Ильин, В.П. Варламов, 2001). При рН 6,0 растворимость образцов хитозана увеличилась в 2-3 раза, при возрастании степени ацетилирования от 0,15 до 0,75.

Таким образом, проведенный анализ данных литературы по систематическим исследованиям в области физико-химических особенностей поверхности дисперсных кремнеземов позволяет выделить единую систему представлений о структуре поверхностного слоя, природе активных центров, строении гидроксильного и гидратного покрова, механизмах адсорбционных и хемосорбционных процессов, на основе которой возможно объяснение многочисленных данных по рассматриваемой проблеме и выяснение общих принципов фиксации на поверхности кремнеземов полярных молекул, что представляет собой важный этап в понимании закономерностей иммобилизации биологически активных соединений на указанных носителях.

Особое место в изучаемых проблемах принадлежит химическому модифицированию поверхности кремнеземов для изменения химического со-

става поверхностного слоя в заданном направлении. Изменение состава поверхности сорбентов может осуществляться и в результате термического дегидроксилирования поверхности или в процессе его гидротермальной обработки. Однако наибольшие возможности для изменения в лучшую сторону свойств кремнезема представляют прививки тех или иных химических групп в результате разнообразных реакций с участием центров поверхности (А.В. Брыкалов, 1993).

Анализ данных литературы показывает, что в настоящее время усилиями многих исследователей разработано значительное число способов химического модифицирования с участием поверхности кремнезёмов. Как справедливо отметил Бурвэл (R.R. Burwell, 1974), используемые при этом приемы часто напоминают органическую химию, чем неорганическую. Разнообразие реакций химического модифицирования поверхности кремнезёмов связано с многосторонностью решаемых при этом важных практических задач.

Закрепленные на поверхности кремнезёмов химические радикалы с функциональными различными группами ( $-\text{NH}_2$ ,  $-\text{COOH}$ ,  $-\text{CH}=\text{CH}_2$ ,  $-\text{CN}$  и др.) открывают перспективы в направлениях синтеза новых специфических сорбентов.

Функциональные органо кремнезёмы после активации с помощью биофункциональных сшивающих реагентов широко используются для иммобилизации биологически активных веществ. Значительный прогресс достигнут в последние годы при создании на основе модифицированных кремнезёмов высокоспецифичных биоспецифических сорбентов. Наконец, изменяя характер связи одного или нескольких лекарственных соединений с поверхностью модифицированного кремнезёма, возможно получение соответствующих аппликационных сорбентов с пролонгированным и сочетанным действием (C.G. Brine, P.R. Austin, 1974; L.Y. Lim, Khor, C.E. Ling, 1999).

Применение кремнезёмов в медико-биологическом направлении требует изучения механизмов их взаимодействия с теми или иными биоструктурами, характеризующих специфической или неспецифической адсорбцией как

биомакромолекул, так и малых неорганических соединений, присутствующих в биосреде. В случае применения иммобилизованных биологически активных веществ возникает необходимость теоретического объяснения особенностей взаимодействия с микроорганизмами не только белков, но и носителя, а также его влияния на защитные функции организма, поведение клеточных мембран. Теория адсорбции хорошо объясняет экспериментальные данные по сорбции малых молекул веществ (Т. Парфит, К. Рочестер, 1986), но при взаимодействии биополимеров с твердым телом возникает много трудностей для теоретической интерпретации данных (Т. Парфит, К. Рочестер, 1986). В случае же взаимодействия дисперсных твердых тел с микроорганизмами, задачи, стоящие перед теорией, усложняются в еще большей степени (Д.Г. Звягинцев, 1973; А.Б. Рубин, 1987).

Практическое использование кремнеземов в медико-биологическом направлении выдвигает определенные требования к соответствующим формам препаратов.

В настоящее время широко обсуждается вопрос о критериях оценки сорбентов различного назначения, применяемых в медицинской практике (гемо-, энтеросорбция) (Н.Т. Картель, Е.Д. Молюк, М.Е. Чудновский, 1988). Для сорбентов выдвинуты следующие требования:

- высокая адсорбционная емкость в отношении широкого спектра биологически активных веществ;
- атоксичность;
- отсутствие повреждающего действия в отношении антител, антигенов;
- механическая прочность;
- легкость стерилизации;
- стабильность свойств при хранении;
- химическая инертность.

На наш взгляд, в наибольшей степени данным требованиям удовлетворяют кремнеземные сорбенты. Существующие проблемы связаны с

выбором видов кремнеземов, способами оптимального модифицирования их поверхности для иммобилизации специфических лигандов (антигенов, антител).

## **1.2. Строение и свойства хитозана, как перспективного компонента синтеза органокремнеземных сорбентов, и медико-биологические аспекты его применения**

К природным полимерам, которые составляют основу опорных, покровных тканей и внешнего скелета низших растений и животных относится хитин. По распространению в природе он считается вторым после целлюлозы полисахаридом и доступность хитина и его производного хитозана на порядок выше других природных полисахаридов (P.R. Austin, C.G. Brine, I.E. Castle, I.P. Zikakis, 1981). Так, ежегодное доступное количество хитина из ракообразных составляет 40 тысяч тонн, из альгинатов – 25 тысяч тонн, а из ирландского мха – 12 тысяч тонн.

Хитин относится к природным полимерам аминсахаров и представляет собой гомополисахарид с неразветвленной цепью, 1,4 – соединенных 2-ацетамидо-2-дезоксид-глюкозных остатков. Впервые данный полисахарид был выделен из панциря майского жука французским ученым Одье в 1823 году (A. Domard, 1966). Хитин имеет кристаллическое строение и при этом различают три взаимопревращающиеся друг в друга формы хитина:  $\alpha$  – ;  $\beta$  – ; и  $\gamma$  – хитин, каждая из которых обладает рядом индивидуальных свойств (R. Yackman, M. Goldberg, 1974).

Хитин образует комплексы с природными биологически активными веществами – протеинами, липидами, каротиноидами, солями. Доказано существование комплексов хитина с протеинами, которые чувствительны к pH среды, при pH 9 находятся в полностью диссоциированном состоянии (B. Jirgensons, 1958). Хитин нерастворим в воде, органических растворителях, не набухает в щелочных растворах (Y. Filar, M.C. Winick, 1977). Данный полисахарид характеризуется биологической активностью, устойчивостью к воло-

но- и пленкообразованию. Однако для практического применения более ценным является хитозан, который растворим в разбавленных кислотах, что расширяет возможности его практического применения. Хитозан был впервые получен в 1859 году при обработке хитина горячим раствором гидроксида натрия (A. Domard, 1996). По химическому строению данный полисахарид представляет собой полимер с неразветвленной цепью  $\beta$ -1-4 соединенных 2-амино-2-дезоксиглюкозных остатков.

Ряд ученых причисляет хитозан к семейству линейных бинарных гетерополисахаридов, как содержащий остатки 2-ацетамид-2-дезоксиглюкозы (звено А) и 2-амино-2-дезоксиглюкозы (звено D) в различных соотношениях, соединенных между собой 1-4 гликозидными связями. Доказано, что распределение звеньев А и D в водных растворах частично деацетилизованного хитина подчиняется статистическому закону Бернулли. Связи А-А менее прочны, чем А-D и D-D, и подвержены гидролизу под воздействием ряда ферментов, например, лизоцима, выделенного из яичного белка. Причем, лизоцим воздействует специфично: только на 2 из 16 возможных тетрад – А-А-А-А и А-А-А-D, преимущественно посередине связи (Л.Ф. Горовой, 1999).

Хитозан нерастворим в воде, слабых и концентрированных растворах щелочей, органических растворителях. Растворяется хитозан в минеральных и органических кислотах. Наличие аминогруппы придает хитозану интересные функциональные свойства (G. Kumar, P. Smith, G.F. Payne, 1999). При значении рН выше 7 аминогруппа депротонизирована, хитозан нерастворим в воде.

Однако в этом интервале рН аминогруппа проявляет нуклеофильные свойства, и неподеленная электронная пара обуславливает возможность образования связей с противоположно заряженными группами ряда соединений, в том числе альдегидов, некоторых кислот, ангидридов, эпоксидных смол. На этом свойстве хитозана основано получение водорастворимых (при рН 7) производных хитозана, в том числе сукцината хитозана.

При низких значениях pH ( $pK_a < 6.3$ ) аминогруппа протонизирована, хитозан представляет собой катионный водорастворимый полиэлектролит. В кислой среде хитозаны, дезацетилированные на 75% и более, растворяются быстро, образуя прозрачные, гомогенные и вязкие растворы. Вязкость растворов хитозана является одним из важнейших его свойств и зависит от ряда факторов (G. Kumar, P. Smith, G.F. Payne, 1999). Она увеличивается с уменьшением температуры дезацетилирования, с ростом концентрации и снижается с повышением температуры. Вязкость растворов хитозана в определенной степени зависит от вида объекта, из которого он выделен. Хитозан, полученный из ракообразных, образует в уксусной кислоте растворы вязкостью 340 сПз, а такой же раствор хитозана из отходов переработки креветок имеет вязкость 180–200 сПз (C.G. Brine, P.R. Austin, 1974). Вязкость растворов хитозана зависит от условий проведения деминерализации. Наличие минерального остатка в хитозане обуславливается снижением скорости его растворения.

Хитозан, как и хитин, во всех случаях устойчив к  $\gamma$ -излучению и к радиации. Как хитин, так и хитозан обладают высокой термической устойчивостью. В Национальном Университете Сингапура проведены исследования по изучению влияния различных режимов тепловой обработки на физические свойства хитозана (L.Y. Lim, Khor, C.E. Ling, 1999). Установлено, что изменение его структуры возможно лишь при нагревании свыше  $170^{\circ}\text{C}$ , разрушение при  $t=230^{\circ}\text{C}$ . Нагревание до  $80^{\circ}\text{C}$  приводит к некоторому снижению жесткости связей, что влечет за собой увеличение растворимости и незначительное повышение кинематической вязкости растворов хитозана. Основные функциональные свойства сохраняются. При стерилизации выше  $120^{\circ}\text{C}$  и выдержке свыше 1 часа наблюдается растворимость хитозана и образование хромофоров, вызывающих изменение окраски от желтой до коричневой за счет межмолекулярных связей с участием  $\text{NH}_2$  – групп. Высокая термическая устойчивость полисахарида позволяет проводить не только пастеризацию, но

и стерилизацию растворов хитозана, что является необходимым условием при использовании его в качестве компонента фармацевтических препаратов.

Благодаря своей химической природе, хитозан способен к различным видам взаимодействия с образованием 4 основных типов связей: ионных, водородных, гидрофобных, связей по типу комплексообразования, в котором хитозан выступает в роли комплексообразователя. Ионные взаимодействия происходят за счет аминной группы. Поликатионный характер данного полисахарида открывает широкие перспективы его использования. Абсолютное большинство поверхностей природных объектов заряжены отрицательно. Поэтому, когда хитозан в катионной форме добавляется к водным растворам (дисперсиям) минеральных, органических или живых объектов, в зависимости от концентрации происходит либо флокуляция (Т.М. Сафронов, Т.М. Бойцова, 1999), либо стабилизация частиц в водной среде. На этом механизме основано, в частности, выделение живых клеток из растворов методом концентрирования в присутствии хитозана (Н.В. Мельник, Н.Д. Скичко, Е.А. Шубина, 1999).

Способность хитозана к комплексообразованию обусловлена наличием неподеленных электронных пар у атома азота и, в ряде случаев, связи образуются за счет неподеленных электронных пар атома кислорода. На этом принципе основано образование многочисленных связей хелатного типа с металлами. Хитозан способен образовывать указанные связи со многими металлами за исключением щелочных и щелочноземельных. Данный полисахарид образует водородные и гидрофобные связи при взаимодействии с рядом органических веществ (A. Domard, 1966).

Описанные выше особенности строения и свойства хитозана свидетельствуют о практическом значении данного полимера, а широкое распространение в природе позволяет рассчитывать на значительную сырьевую базу промышленного значения (В.Е. Красавцев, 1999; С.В. Немцев, В.С. Божко, 1999).

Ведущую роль в мире по исследованиям хитозана и хитина, производству данных полисахаридов занимает Япония (В.П. Быков, 1999). Именно в Японии в 1972 году впервые в мире начато производство хитозана, которое к настоящему времени достигло около 2000 тонн в год. В США выпускается свыше 700 тонн хитозана в год, и по мнению американских экспертов, называющих хитозан «полимером XXI века», мировой рынок продукции на основе хитозана в данном столетии будет носить глобальный характер (В.П. Варламов, 1999).

Основным потребителем хитозана (В.П. Варламов, 1999) являются здравоохранение, на долю которого приходится до 65% производимого хитозана. Далее следует сельское хозяйство (12%), утилизация отходов и очистка сточных вод (7%), пищевая промышленность (5%), косметическая промышленность (5%).

В настоящее время известно более 70 направлений использования хитина и хитозана и их производных в различных отраслях промышленности, наиболее важными из которых во всем мире признаны:

– пищевая промышленность – в качестве загустителя и структурообразователя продуктов диетического питания, способствующих выведению радионуклидов из организма; для создания простых и многокомпонентных эмульсий, соусов, паст (В.Д. Богданов, 2001; Т.М. Бойцова, 2002), съедобных колбасных оболочек; осветления пива, соков, вин (N.V. Soto-Peralta, H. Mueller, D. Knorr, 1989);

– медицина (Г.И. Тюпенко, И.Н. Горбачева, Е.Е. Скорикова, 2001) – для лечения ран, ожогов, язв (В.С. Лившиц, 1988; Б.А. Никонов, С.Ф. Антонов, А.И. Кобатов и др., 1998; B. Sagah, P. Mamlyn, D. Wales, 1991): производства хирургических нитей, искусственной кожи, лекарственных форм антисклеротического, антикоагулянтного и антиартрозного действия; диагностики и лечения опухолей (К.А. Трескунов, Б.А. Комаров, 1998), язвы желудка: хитозан улучшает всасывание и эффективность труднорастворимых лекарственных форм (O. Felit, P. Buri, R. Gumi, 1998); эффективен при лечении



заболеваний зубов и полости рта (Г.И. Тюпенко, И.Н. Горбачева, Е.Е. Скоринова, 2001); в качестве средства борьбы с ожирением (E. Ernst, M.H.Pittler, 1998), связывания и выведения из организма вредных веществ (Н.А. Самойлова, В.Е. Рыженков, И.Я. Ямчков, 1999; В. Sagah, P. Mamlyn, D. Wales, 1991); профилактики и лечения сердечно-сосудистых заболеваний (В.Г. Терещенко, 1999); ветеринарии (А.И. Албулов, А.Я. Самуйленко, Н.Э. Нифантьев и др., 1999; М. И. Рабинович, А.Р. Таирова, 1999);

– косметика – использование в качестве увлажнителя, эмульгатора, антистатика и смягчающего средства для ухода за волосами и кожей (Л.В. Симонова, Л.К. Пашук, 1998). В косметических препаратах хитозан выступает как биостимулятор, усиливая физиологическое действие альгиновых кислот;

– сельское хозяйство – в качестве биостимулятора, обеспечивающего повышение урожайности овощей на 25–40%, средства борьбы с заболеваниями растений (С.Л. Тютерев, 2000), почв, животных; специальные покрытия для фруктов, увеличивающие сроки хранения (Le Doan Dien, Tran Quang Vinh, 1996); кормовые добавки с хитозаном (Е.А. Гамыгин, Т.И. Сафонова, Е. Д. Близнюк, И.В. Сушков, 1999);

– биотехнология – очистка сточных вод от загрязнений (С.Л. Тютерев, 1998; S.P. Mayer, 1989); иммобилизация ферментов (В.А. Веселова, Т.Н. Шеховцова, Г.Д. Бадун, 1999); концентрирование баксуспензий, сорбция тяжелых металлов и радионуклидов; добавка при производстве стиральных порошков, производство биоразлагаемых полимерных материалов (В.А. Веселова, Т.Н. Шеховцова, Г.Д. Бадун, 1999).

На мировом рынке имеется несколько видов хитина и хитозана, различающихся по качеству и направлению использования: медицинский, пищевой, стандартный для технических целей и специального назначения.

Хитозан образует гель более текучий и более стабильный, чем другие некрахмальные полисахариды (Л.В. Симонова, Л.К. Пашук, 1998). Хитино-

вые волокна выполняют те же функции, что и растительные, однако эффективность их как минимум на 55% выше.

Основная функция коммерческих препаратов хитозана медицинского назначения заключается в снижении массы организма при значительной его детоксикации, что уменьшает риск заболеваний сердечно-сосудистой системы, рака прямой кишки, холецистита (Р. Муццарели, 2001). Способность хитозана не только впитывать, но и химически связывать липиды и продукты их распада, при создании фармакологических препаратов может быть усилена. Для множественного лечебно-профилактического эффекта хитозан и его производные соединяют с органическими кислотами, витаминами, антоцианами, индолами и другими биологически активными веществами (Л.В. Сиимонова, Л.К. Пашук, 1998; В.П. Варламов, 1999).

Актуальным и перспективным является использование хитозанов в качестве сорбента.

По сравнению с другими сорбентами, хитозан в составе препаратов в наибольшей степени отвечает требованиям сорбентам медицинского назначения (Р. Муццарели, 2001):

- механическая прочность;
- обладание заданными гранулометрическими параметрами;
- наличие определенного химического состава;
- пористость структуры;
- минимально травмирующий эффект структуры на живые клетки;
- отсутствие связывания белков из крови и лимфы;
- отсутствие нарушения минерального баланса в организме;
- наличие селективности в отношении определенных классов соединений;
- высокая сорбционная емкость;
- отсутствие токсического воздействия на органы и ткани биологического объекта.

Перспективным представляется направление по использованию хитозана в качестве компонента для синтеза композиционных сорбентов, применяемых для иммобилизации лигандов и конструирования на основе данных сорбентов диагностических тест систем.

### **1.3. Культивирование микроорганизмов с применением метода их иммобилизации на сорбентах**

Одним из перспективных направлений при разработке технологий по получению различных биологически активных веществ и биомассы микроорганизмов являются использование иммобилизованных на носителях микробных клеток. Для иммобилизации микроорганизмов в качестве носителей широко используют микрогранулированные сорбенты на основе полиакриламидного геля, желатины, альгината кальция (Д.Вудворд, 1988).

Для иммобилизации микроорганизмов используется альгинат кальция. Альгинат – основной структурный полисахарид бурых морских водорослей и состоит из регулярных последовательностей, связанных между собой в положениях 1 и 4 остатков  $\beta$ -D – маннопиранозилуроната и  $\alpha$  - L - гулопиранозилуроната (D.A. Rees, E.A. Morris, 1982). Условия включения в гель альгината кальция мягкие, полимер можно стерилизовать автоклавированием, и, кроме того, процесс иммобилизации обратим, что достигается добавлением агента, связывающего кальций (например, ЭДТА или лимонной кислоты). Установлено, что стабильность геля возрастает с увеличением концентрации полимера, но при высоких концентрациях альгината кальция суспензия альгинат/микробные клетки становится очень вязкой, что затрудняет процесс образования гранул. При автоклавировании вязкость раствора альгината кальция уменьшается из-за частичного гидролиза полимера (D.A. Rees, E.A. Morris, 1982).

В биотехнологии для включения клеток в гель применяют полисахариды каррагинаны, содержащие в структуре эфиры  $\alpha$  - D - галактопиранозил-

серной кислоты. Нерастворимую в воде фракцию полимеров получают добавлением ионов кальция к водному экстракту каррагинана. Установлено, что температура и качество геля зависят как от концентрации полимера, так и от количества присутствующих катионов. Так, 5% водный раствор каррагинана, поставляемого фирмой Sigma Chemical CO, находится в жидком состоянии при температуре  $> 45 - 50^{\circ}\text{C}$ , а такой же раствор препарата каррагинана, поставляемого фирмой FMC Corporation, специально предназначенного для иммобилизации клеток, – при температуре  $> 25 - 30^{\circ}\text{C}$  (Н.У. Wand, D.I. Nettwer, 1982).

В последнее время для иммобилизации клеток микроорганизмов широко применяют полиакриламид. Однако некоторые вещества, используемые при радикальной полимеризации акриламидов, токсичны для микробных клеток.

Разработан метод устранения контакта между клетками и токсическими веществами полиакриламида. Полученный линейный полимер полиакриламида, содержащий гидразиновые группы, смешивали с клетками, а затем полимерные цепи сшивали глиоксалем. Клетки *Mentha*, иммобилизованные данным способом, сохраняли жизнеспособность и биосинтетическую активность (A.Freeman, 1981).

Для иммобилизации клеток *Capsicum frutescens* к суспензии их культур добавляли предварительно приготовленные кубики пористого полиуретана. Клетки, связанные внутри полимера, использовали в течение всего периода культивирования, составляющего 21 сутки. После пересева в свежую среду через 3-4 суток в иммобилизационном состоянии оставалось не менее 95% клеток (Д.Вудворд, 1988).

Известно, что органические носители имеют некоторые отрицательные характеристики, к которым относятся неспецифическая сорбция, подверженность микробиологической атаке, нестандартность состава (Д.Вудворд, 1988).

Перспективно использование для иммобилизации микроорганизмов композиционных сорбентов, имеющих заданный состав и определенную направленность биологического действия (А.В. Брыкалов, 1991; А.В. Брыкалов, 1993; А.В. Брыкалов, О.В. Воробьева, 1996).

Применение метода иммобилизации, как показывает анализ многочисленных обзорных публикаций и монографий, способствует повышению эффективности биотехнологических процессов, и при этом следует остановиться на многих составляющих, которые обосновывают преимущества иммобилизованных систем (В.Н. Постнов, 1983; А.В. Брыкалов, 1991; А.В. Брыкалов, О.В. Воробьева, 1996; И.В. Владимцева, В.М. Самыгин, А.А. Степин, О.В. Колотова, 2001; И.В. Владимцева, 2002; Р. Monson, 1978).

При иммобилизации отмечается значительное увеличение ферментативной активности микробных клеток. В ряде работ авторов было показано, что в результате иммобилизации наблюдается повышение удельной активности микроорганизмов (Д.Вудворд, 1988; И.В. Владимцева, В.М. Самыгин, А.А. Степин, О.В. Колотова, 2001; И.В. Владимцева, 2002; Р. Monson, 1978).

По-видимому, это связано с увеличением скорости биоконверсии субстрата в целевой продукт, увеличение скорости потребления субстрата ферментативной реакции.

В результате иммобилизации достигается возможность многократного использования биокаталитической системы. В работах исследователей описаны экспериментальные данные по стабильной работе ферментеров с иммобилизованными микробными клетками в течение от 9 до 20 циклов биотехнологического процесса (Д.Вудворд, 1988; И.В. Владимцева, В.М. Самыгин, А.А. Степин, О.В. Колотова, 2001).

Таким образом, многократность применения иммобилизованных биокатализаторов позволяет перейти от периодических к более технологичным непрерывным процессам (Д.Вудворд, 1988; И.В. Владимцева, 2002), значительны при этом экономические преимущества.

Одним из аспектов иммобилизации микробных клеток на носителях является изменение метаболизма микроорганизмов. Автор (P. Monson, 1987) установил пятикратное увеличение метаболической активности и изменение спектра метаболитов дрожжевых клеток вследствие их иммобилизации. Культура гриба рода *Aspergillus* в иммобилизованном состоянии, в отличие от свободных клеток, продуцирует несколько пектинрасщепляющих изоферментов, различающихся по электрофоретической подвижности, оптимуму pH, молекулярной массе и механизму действия на субстрат. Основными причинами, которые влияют на изменение метаболизма микроорганизмов при иммобилизации, является изменение снабжение клеток кислородом, удаление углекислого газа, а также изменение проницаемости мембран микробных клеток (P. Monson, 1978).

Важной технологической особенностью применения иммобилизованных систем является то, что значительно упрощаются стадии выделения, концентрирования и очистки целевого продукта. При иммобилизации микробных клеток, например, в альгинате кальция возможно проведение прямой экстракции антибиотика циклогексимидина из культуральной жидкости, и при этом из технологической схемы исключаются стадии промывки, экстракции растворителями, ионообменной хроматографии, степень очистки указанного антибиотика достигает 95% (Д.Вудворд, 1988; D.A. Rees, E.A. Morris, 1982).

Самым главным преимуществом при использовании иммобилизованных систем является то, что в целом повышается эффективность, производительность биотехнологического процесса (Д.Вудворд, 1988; И.В. Владимирова, 2002; D..A. Rees, E.A. Morris, 1982).

Таким образом, по сравнению с традиционными процессами микробиологического синтеза, использование в биотехнологии иммобилизованных клеток микроорганизмов приводит к увеличению ферментативной активности микробных клеток, увеличению скорости биоконверсии субстрата в конечный продукт, стабилизации свойств микробных ферментов, повышению

уровня термостабильности, устойчивости к действию ингибиторов, создается возможность целенаправленного управления изменением метаболизма микроорганизмов.

Возможности многократного использования иммобилизованных систем, а также упрощение и сохранение стадий выделения, концентрирования и очистки конечного продукта в целом, повышают производительность биотехнологических процессов.

Важную роль при реализации преимуществ играет аппаратное оформление процессов с иммобилизованными клетками, то есть выбор конструкции реакторов. Обычные биореакторы с простым перемешиванием не подходят для иммобилизованных клеток, так как разрушают частицы носителя (B.V. Chomel, E.E. DeBess, D.M. Mabqameie, 1994). В литературе описаны различные типы биореакторов, рассмотрены их преимущества и недостатки (П.А. Вершилова, А.А. Голубева, 1972; И.М. Климова, В.Г. Пушкарь, 1995; В.И. Ефременко, 1996; M.F. Clark, A.N. Adams, 1977; B.V. Chomel, E.E. DeBess, D.M. Mabqameie, 1994). Выбор конструкции биореактора для процессов с иммобилизованными клетками зависит от метода иммобилизации, от необходимости поддержания жизнеспособности микроорганизмов и снабжения их кислородом. Для конструирования реакторов нужно учитывать размеры частиц носителя, их плотность, устойчивость к механическим воздействиям, необходимость аэрации и перемешивания жидкости, проходящей через ферментер (M.F. Clark, A.N. Adams, 1977). Высокая концентрация микроорганизмов в рабочем объеме реактора с иммобилизованными клетками определяет необходимость создания высоких скоростей массопереноса, что особенно важно для аэробных процессов (П.А. Вершилова, А.А. Голубева, 1972).

Для культивирования иммобилизованных микроорганизмов описаны различные конструкции ферментеров, например, реактор периодического действия с рециркуляцией среды (D.M. Boorsma, J.G. Strefkert, 1979), реактор с вращающимися дисками, реактор с «кипящим слоем» (P.Z. Masson, C.Z.

Cambiasso, D. Collet-Cassat, C.G. Magmisson et al., 1981). Была предложена оригинальная конструкция реактора для клеток, включенных в гелевый блок. Суспензию микроорганизмов в растворе альгината переносили в аппарат, в который вертикально вставляли металлические стержни. После окончания гелеобразования стержни вынимали. В результате получается блок геля, необходимый для удаления углекислого газа и подачи субстрата. Такой ферментер, по данным авторов, работал стабильно в течение 111 дней (Д.Вудворд, 1988).

Л.В. Мирясова с соавторами в 1999 году опубликовали эффективную технологию культивирования иммобилизованных коклюшных бактерий (Л.В. Мирясова, 1999). Стенки биореактора “Биотек” с рабочим объемом 2 л авторы выстилали полосами губчатого полиуретанового носителя, который служил для иммобилизации микроорганизмов. Созданы также специальные реакторы для культивирования иммобилизованных животных и растительных клеток (L.V. Tabatabai, V.L. Deyoe, 1984).

Разработанные учеными методики культивирования иммобилизованных клеток в настоящее время широко применяются во многих отраслях биотехнологии: в процессе спиртовой ферментации при получении этанола, в пивоварении, виноделии, приготовлении фруктовых и овощных продуктов, уксуснокислой ферментации, в молочной промышленности, при получении аминокислот, антибиотиков, стероидов, углеводов, ферментов, алкеноксидов (Д.Вудворд, 1988; M.F. Clark, A.N. Adams, 1977). Важной областью применения иммобилизованных клеток является экология, поскольку прикрепленные к носителям микроорганизмы могут осуществлять метановое сбраживание сточных вод, биodeградацию ксенобиотиков, деструкцию поверхностно активных веществ, нефтяных загрязнений. Однако коммерциализация технологий, предусматривающих использование иммобилизованных микроорганизмов, требует продолжения экспериментов с целью разработки более эффективных и экономичных технологических процессов (В.Г. Терещенко, 1999; И.В. Владимцева, В.М. Самыгин, А.А. Степин, О.В. Колотова, 2001;



И.В. Владимцева, 2002; M.F. Clark, A.N. Adams, 1977; H.J. Konig, H. Vob, 1990).

Использование носителей с магнитными свойствами для иммобилизации биообъектов открывает новые перспективы интенсификации процессов биотехнологии. Применение магнитных носителей позволяет повысить массопередачу в биореакторах, особенно при аэробных процессах, где массопередача является лимитирующим фактором (S.P. Stahe, A. Marmonier, M.I. Micoud, 1982). По мнению некоторых авторов (S.P. Stahe, A. Marmonier, M.I. Micoud, 1982), использование ферментеров с генераторами магнитного поля для непрерывных процессов позволит отказаться от перемешивания с помощью обычных мешалок. Носители биообъектов с магнитными свойствами приобретают повышенную стабильность и могут быть использованы в реакторах с большими скоростями потоков и более высокими давлениями (S.M. Avrameas, J.L. Gutsdon, 1980). Магнитные свойства носителей биокатализаторов (ферментов и клеток) позволяют с помощью магнитного поля удалять их после использования в биотехнологическом процессе (В.И. Ефременко, 1996; И.А. Соколова, А.Ф. Брюханов, 2000).

Перспективы магнитного манипулирования микроорганизмами – продуцентами очень заманчивы, однако до настоящего времени разработке этих технологий уделялось мало внимания. В научной литературе встречаются публикации по применению иммобилизованных в магнитные носители ферментов для биотехнологических целей (Д.Вудворд, 1988; В.И. Ефременко, 1996).

В работах авторов (И.В. Владимцева, В.М. Самыгин, А.А. Степин, О.В. Колотова, 2001; И.В. Владимцева, 2002) методически обоснованы и экспериментально представлена биотехнология использования в магнитных носителях форм инокулянтов при глубинном культивировании бактериальных клеток. Показаны технологические преимущества применения магнитоуправляемого инокулянта, позволяющие упростить работу с бактериальными клетками и сократить время получения биомассы микроорганизмов.

Имеются сообщения о создании в США (А.В. Stavitsky, 1964), Швеции и Англии (R. Sting, G. Ortmann, 2000) компаний, работающих в области биотехнологии с биокатализаторами, иммобилизованными в магнитные носители. Многообещающие исследования в этой области в настоящее время находятся в начальной стадии изучения.

#### **1.4. Применение магнитных иммуносорбентов для диагностики особо опасных инфекционных заболеваний и индикации их возбудителей**

На современном этапе развития биотехнологии и микробиологии весьма актуальными являются исследования, направленные на решения проблемы разработки методов экспресс - диагностики особо опасных инфекций и индикации их возбудителей. Для достижения цели широко используют методы: радиоиммуноанализ (РИА), иммунофлюоресценции (РИФ), иммуноферментный анализ (ИФА). Достижением современной науки является разработка сочетанных методов детекции возбудителей особо опасных инфекций: магноиммуносорбция – ПЦР – анализ и магноиммуносорбция – хемиллюминесцентный иммунный анализ (Е.Н. Афанасьев, И.С. Тюменцева, М.Н. Касаторная, 1999; И.А. Соколова, Г.И. Лямкин, А.Ф. Брюханов, 2000).

Многочисленные монографии и обзорные статьи содержат сведения об особенностях методов РИА, РИФ и иммуноферментного анализа, их чувствительности, специфичности, а также данные о преимуществах и недостатках каждого из методов (Г.Т. Нго, Г.М. Ленхофор, 1988; Е.В. Анапова, Л.С. Каменова, И.С. Мещерякова, 1989; И.В. Владимцева, А.А. Степин, 1990; А.Д. Манолов, Л.Ф. Зыкин, Г.П. Голубинский, 1991; Л.Ф. Зыкин, А.Т. Яковлев, 1993; Н. Webster, J. Bone Adrian, A. Katherine Webster, J. Terence Wilkin, 1990).

В соответствии с данными литературы (Б.Б. Дрантиев, А.М. Егоров, 1982), иммуноферментный анализ обладает преимуществом перед другими методами экспресс - диагностики из-за своей высокой специфичности и чув-

ствительности. В основе данного метода лежит специфическое взаимодействие определяемого вещества с антителами и детекция комплекса антиген – антитело с помощью ферментативной реакции (Б.Б. Дрантиев, А.М. Егоров, 1982; Г.Т. Нго, Г.М. Ленхофор, 1988;).

Принцип метода ИФА заключается в том, что после иммобилизации антител (антигенов) на нерастворимой основе вносят исследуемый биологический материал, и образовавшийся комплекс антиген-антитело выявляют с помощью конъюгата антител (антигена) с ферментом, активность которого регистрируют по превращению субстрата спектрофотометрически (Б.Б. Дрантиев, А.М. Егоров, 1982).

Ферментами – маркерами, используемыми в ИФА, могут быть щелочная фосфатаза, галактозидаза, глюкооксидаза, глюкоамилаза, пенициллиназа, но чаще применяют пероксидазу (Б.Б. Дрантиев, А.М. Егоров, 1982; Г.Т. Нго, Г.М. Ленхофор, 1988;).

Для приготовления иммуноферментных конъюгатов обычно используют периодатный, глутаральдегидный методы (Н.С. Умнова, И.П. Павлова, Г.В. Михеева, 1986; Р.К. Nakane, А. Kawaoie, 1974), иногда используют малеимидный метод приготовления пероксидазного конъюгата (К. Kato, Y. Hamguchi, Н. Fukui, 1975), но наиболее перспективным считается периодатный метод окисления (S. Anaokar, P.J. Sorry, J.C. Standefer, 1979).

В качестве твердой фазы тест-систем, основанных на принципах иммуноферментного анализа, используют синтетические полимеры, такие как полистирол, поливинил, дакрил и другие в виде пробирок (Б.Б. Дрантиев, А.М. Егоров, 1982), 96-луночных планшет (Г.Т. Нго, Г.М. Ленхофор, 1988), магнитных частиц (А.В. Волков, М.А. Москвина, А.Л. Волынский и др. 2001), магнитных бус (Н. Webster, J. Bone Adrian, А. Katherine Webster, J. Terence Wilkin, 1990). Наиболее широко применяются 96-луночные планшеты из полистирола, т.к. этот полимер доступен и химически инертен. В работе авторов (Г.Т. Нго, Г.М. Ленхофор, 1988) отмечено, что поверхность любых планшетов характеризуется неравномерностью распределения гидрофобных

участков. Так, на равных участках полистирола может находиться различное остаточное количество химического компонента, используемого в процессе получения полимера. Нестандартность адсорбционной поверхности полистироловых планшетов приводит к непрочному связыванию антител и их десорбции на этапах ИФА. В связи с этим необходимы исследования по оптимизации способов получения твердых носителей, обеспечивающих прочную иммобилизацию лигандов (Ат и Аг) при сохранении их биологической активности.

Согласно данным литературы (И.В. Березин, А.А. Клесков, 1976; М. Тривен, 1983; И.В. Владимцева, А.А. Степин, 1990; Н. Webster, J. Bone Adrian, A. Katherine Webster, J. Terence Wilkin, 1990), связывание антител с твердым носителем проводят путем физической адсорбции или методом ковалентной иммобилизации. В случае физической адсорбции носитель в течение нескольких часов обрабатывают раствором соответствующих антител, при этом связывание антител с поверхностью полистиролового носителя обеспечивается, в основном, за счет гидрофобных взаимодействий. Затем избыток антител отмывают, а носитель помещают в раствор альбумина для предотвращения неспецифической адсорбции конъюгата. Связывание белка с носителем зависит от концентрации, причем совместное влияние рН и ионной силы особенно проявляется при более высоких концентрациях белка в растворе. Связывание белков с полистироловым носителем зависит от времени и температуры обработки. Так, при 37<sup>0</sup>С связывание белка вдвое больше, чем при 4<sup>0</sup>С. Кроме того, при 3-х часовой иммобилизации уровень адсорбции белка достигает 80%, после 36-ти часовой – 100% (Г.Т. Нго, Г.М. Ленхофор, 1988).

Инкубирование носителя с белком, например альбумином или желатиной, позволяет заблокировать остаточные свободные центры связывания, с которыми могли бы неспецифически взаимодействовать молекулы конъюгата.

Первые работы по диагностике чумы у людей, хищных животных и грызунов с помощью ИФА для определения иммуноглобулинов и специфического чумного антигена фракции 1 были опубликованы в работах (Е.П. Голубинский, В.С. Рудник, М.П. Рудник, 1980; D.C. Cavanaugh, M.K. Fortier, D.M. Robinson, 1979). В 1980г. Е.П.Голубинский с соавторами (Е.П. Голубинский, В.С. Рудник, М.П. Рудник, 1980) показали возможность обнаружения антигена Ф1 чумного микроба иммуноферментным методом при исследовании чистых и смешанных культур возбудителя чумы. В.И.Журавлев с соавторами (В.И. Журавлев, А.Т. Яковлев, В.С. Рыбкин, 1983) использовали ИФА для обнаружения антигенов не только в бактериях чумы, но также и в органах биопробных животных и диких грызунов из природных очагов. В работе авторов (О.Н. Лопаткин, Н.Т. Лазарева, Л.И. Калмыкова, О.В. Малецкая, 1985) показаны преимущества ИФА на основе моноклональных антител к Ф1 чумного микроба. Была разработана иммунопенициллиназная тест-система на основе моноклональных антител к Ф1. В настоящее время для идентификации капсульного антигена Ф1 возбудителя чумы выпускаются иммуноферментные моноклональные тест-системы (Л.Ф. Зыкин, А.Т. Яковлев, 1993).

ИФА для иммунологического подтверждения туляремии впервые предложили авторы (E. Carlsson, A. Lindberg, 1979). В этой же работе показано, что ИФА в 10 раз чувствительнее РА. Основное преимущество ИФА при индикации туляремии перед обычными тестами – его способность рано выявлять антитела. Методика ИФА для туляремийных антигенов и антител была одновременно апробирована Е.П.Голубинским с соавторами (Е.П. Голубинский, С.П. Меринов, Л.В. Меринова, 1984). Чувствительность ИФА при исследовании сыворотки реконвалесцентов оказалась в 10 – 1000 раз выше РА. По данным В.М.Поляченко с соавторами (В.М. Поляченко, С.П. Меринов, Е.П. Голубинский, 1983), туляремийные антигены обнаруживаются в ИФА в концентрации  $1,2 \times 10^5 - 2 - 10^5$  мк/мл и 40–80 нг/мл. Близкие показатели чувствительности получили И.С.Мещерякова с соавторами (И.С. Мещерякова, И.С. Умнова, К.А. Шаханина, 1986). В работе (Е.Г. Чернявская,

рякова, И.С. Умнова, К.А. Шаханина, 1986). В работе (Е.Г. Чернявская, П.Г. Свешников, Е.С. Северин, Н.Ф. Василенко, 1990) предложен ИФА с использованием моноклональных антител к антигену возбудителя туляремии. По результатам исследований установлено, что использование пероксидазных конъюгатов на основе моноклональных антител позволяет выявлять 10–30 нг/мл дезинтеграта или  $75 \times 10^3 - 150 - 10^3$  мк/мл вакцинного штамма и не дает перекрестных результатов с гетерологичными микроорганизмами. В.С.Хлебников с соавторами (В.С. Хлебников, Г.В. Гречко, С.С. Ветчинин, 1990) предложили тест-систему для диагностики туляремии на основе моноклональных антител и ферментов пероксидазы и пенициллиназы. Чувствительность таких конъюгатов 1–5 нг/мл липополисахарида и  $8 - 30 \times 10^5$  мк/мл.

В работе (S.M. Avrameas, J.L. Gutsdon, 1980) представлены данные об использовании магнитных сорбентов в разработанной тест-системе ИФА антигенов *Y.pestis*. Установлены оптимальные параметры ИФА: зависимость адсорбирующей способности магносорбента от его содержания в пробе, зависимость степени адсорбции антигена от продолжительности инкубации его с МС. Результаты исследований показали, что 15–45 мг МС в пробе и 20–30 мин инкубации достаточно, чтобы произошло «насыщение» его клетками. Чувствительность метода в случае обнаружения клеток составляла  $10^4 - 10^5$  мк/мл, при обнаружении фракции 1–10 нг/мл.

Представленный выше материал дает возможность сделать заключение о высокой чувствительности и специфичности ИФА при определении антигенов чумного микроба, о целесообразности его применения для диагностики чумы и туляремии, индикации в объектах внешней среды, эпизоотологического обследования природных очагов этой инфекций.

Многочисленные работы последних лет (И.М. Климова, В.И. Ефременко, В.Г. Пушкарь, 1989; М.Н. Касторная, Е.Н. Афанасьев, И.С. Тюменцева, 2000; И.В. Владимцева. 2002) показали перспективность использования устойчивых иммуносорбентов для конструирования высокоэффективных диагностических тест-систем.

Для иммобилизации различных лигандов используют сорбенты, обладающие магнитными свойствами (И.М. Климова, В.И. Ефременко, В.Г. Пушкарь, 1989; И.В. Жарникова, А.В. Брыкалов, И.С. Тюменцева, 1994). В работе (С.Д. Гавенский, И.М. Климова, В.И. Ефременко, В.Г. Пушкарь, В.Ю. Перов, 1989) описано создание иммуносорбентов с магнитными свойствами, что значительно расширило область их применения. Показана возможность использования отечественных препаратов магнитных иммуносорбентов для концентрирования и идентификации патогенных микроорганизмов. Разработанный способ упрощает проведения анализов и ускоряет манипуляции на всех этапах исследования. Применение магносорбентов исключает необходимость предварительного концентрирования микроорганизмов на мембранных фильтрах или путем центрифугирования, позволяет максимально избавиться от многочисленной сопутствующей микрофлоры и повышает вероятность выделения микробов из больших объемов исследуемых проб.

В работах (И.В. Владимцева, 2002; И.М. Климова, В.И. Ефременко, В.Г. Пушкарь, 1989; И.В. Жарникова, А.В. Брыкалов, И.С. Тюменцева, 1994) описано получение магносорбентов и преимущество их использования. Благодаря применению магнитного поля для сепарации магнитных сорбентов удается исключить центрифугирование, тем самым сокращается время индикации особо опасных инфекций. Кроме того, увеличивается скорость отмывания твердой фазы на промежуточных этапах анализа.

Материалы, используемые для приготовления магнитных сорбентов, должны удовлетворять следующим требованиям: обладать инертностью по отношению к биологическим препаратам, иметь мелкодисперсное состояние, коррозионную устойчивость в жидких средах, хорошую включаемость в гранулы, стабильность свойств и механическую прочность. Введение магнитного материала в полимерные гранулы осуществляют во время их приготовления методами эмульсионной полимеризации (И.М. Климова, В.И. Ефременко, В.Г. Пушкарь, 1989). Для придания магносорбентам биоспецифических свойств проводят иммобилизацию лигандов, которая обеспечивает

прочное присоединение их на поверхность сорбентов. Активные функциональные группы на носителе чаще всего получают предварительной активацией его поверхности, которая может осуществляться в достаточно жестких условиях с использованием широкого круга реагентов. Но при этом должны соблюдаться условия, обеспечивающие сохранность функциональных групп лигандов, эффективность ковалентного связывания антител или антигенов.

Магноиммуносорбенты могут эффективно быть использованы для создания твердофазных диагностических тест-систем, а также для индикации возбудителей инфекционных заболеваний в объектах окружающей среды. Весьма актуальны разработки новых методов выделения и индикации возбудителей инфекционных заболеваний и их антигенов из объектов внешней среды. С этой целью в практической микробиологии в последнее время для выделения культур микроорганизмов из объектов внешней среды успешно применяют сорбционные методы и, в частности, магноиммуносорбенты, особенно в тех случаях, когда концентрация исследуемых бактерий в пробах низкая, а исследуемые объекты загрязнены посторонней микрофлорой. Магноиммуносорбенты (МИС) осуществляют на своей поверхности селективное концентрирование микроорганизмов (И.М. Климова, В.И. Ефременко, В.Г. Пушкарь, 1989; И.М. Климова, В.Г. Пушкарь, 1995; И.В. Владимцева, В.М. Самыгин, А.А. Степин, О.В. Колотова, 2001; И.В. Владимцева, 2002).

Преимуществами использования МИС является то, что при их использовании не требуется предварительного концентрирования исследуемых проб с отделением выявляемых микроорганизмов от контаминирующей микрофлоры и других примесей, возможность проведения индикации на качественно более высоком уровне. В результате использования магносорбентов, способных осуществлять на себе селективное концентрирование микроорганизмов, появляется возможность исследования проб с высокой степенью загрязненности, возможность забора проб при неорганических объемах из объектов внешней среды, с низкой концентрацией микроорганизмов. При этом метод обладает высокой чувствительностью и специфичностью к близкородст-



венным микроорганизмам ((И.М. Климова, В.И. Ефременко, В.Г. Пушкарь, 1989).

В работах авторов (И.В. Жарникова, А.В. Брыкалов, И.С. Тюменцева, 1994; Е.Н. Афанасьев, 2000) показано, что магноиммуносорбентные сибирезявенные антиспоровые и чумные бивалентные диагностикумы были с положительным результатом испытаны в полевых условиях применительно к иммуноферментному и количественному иммунофлюоресцентному анализам. Так, во время вспышки сибирской язвы в Красногвардейском районе Ставропольского края в июле 1996 г. были проведены исследования 66 проб, подозрительных на наличие возбудителя этой инфекции (22 пробы сливочного масла, 10 проб сухого молока, 5 проб сыра, 2 пробы воды, 2 смыва с оборудования сыродельного цеха, 1 проба ила из водоема, 10 проб почвы, патологический материал от крупного рогатого скота и др.)

Параллельно с классическим методом пробы исследованы в полимерно-цепной реакции, иммуноферментном анализе и количественной иммунофлюоресценции с применением МИС. Положительные результаты исследования материала на наличие возбудителя сибирской язвы всеми перечисленными методами получены из патологического материала от КРС. В одной из проб (почва из очага после дезинфекции) в КИФА с применением МИС выявлены споры сибирезявенного микроба. Положительные результаты исследования почвы с МИС после дезинфекции при отсутствии выделения культуры могут свидетельствовать о наличии нежизнеспособных спор и, с одной стороны, быть полезными для ретроспективного анализа эпизоотологической ситуации, а с другой – для оценки качества проводимой дезинфекции.

Полевые испытания чумных бивалентных МИС проводили в 1997, 1998 гг. в Центрально-Кавказском природном очаге чумы (аул Хасаут Карачаево-Черкесской Республики и с.Булунгу Кабардино-Балкарской Республики). Исследовано 344 пробы (блохи разных видов, почва из гнезд грызунов, субстра-

ты гнезд, трупы грызунов, а также суспензии органов биопробных животных, зараженных взвесью из блох).

Кроме проведения иммуноферментного анализа и количественной иммунофлуоресценции с использованием МИС, пробы параллельно исследовались традиционными методами: бактериологическим (прямой посев материала), биологическим (заражение белых мышей) и серологическим (проведение РПГА). При этом процент положительных находок при использовании магноиммуносорбентов был выше в 3,8 раза, что свидетельствует о целесообразности применения МИС при изучении природных очагов чумы (Е.Н. Афанасьев, 2000).

Выступая в качестве твердой фазы, МИС используются в бактериологическом и экспрес-анализах: иммуноферментом, иммунофлюоресцентном и других иммуноанализах, обеспечивая их специфичность и чувствительность (Е.В. Анапова, Л.С. Каменова, И.С. Мещерякова, 1989; А.В. Манолов, А.Ф. Зыкин, Е.П. Голубинский, 1991).

В работе авторов (И.В.Жарникова, А.В.Брыкалов, И.С.Тюменцева, 1994) представлены сведения о конструировании композиционных магноиммуносорбентов (КМИС) для диагностических тест-систем на основе сорбционного материала –аэросила, обладающего стандартностью состава и структурных характеристик. Показано, что использование МИС в качестве твердой фазы в ИФА по сравнению с полистироловыми планшетами имеет преимущества, связанные с повышением чувствительности метода в 1000 раз по корпускулярным антигенам. Отмечено, что проведение ИФА с использованием МИС обеспечивает экспрессность анализа микроорганизмов с высокой чувствительностью и специфичностью, время постановки анализа сокращается в 7 раз. Лиофилизированные препараты КМИС стабильны в течение 10 лет, тогда как хранение сенсibilизированных планшетов ограничено 7 сутками, что свидетельствует о преимуществах применения КМИС в ИФА. Были сконструированы магноиммуносорбентные диагностикумы для использования их в методах иммунофлуоресценции и определена

чувствительность КМИС, которая составила  $1 \times 10^2 - 1 \times 10^3$  мк. кл./мл, что в 100–1000 раз превышает чувствительность общепринятого метода иммунофлуоресценции (И.В.Жарникова, А.В.Брыкалов, И.С.Тюменцева, 1994; Е.Н.Афанасьев, И.С. Тюменцева, М.Н. Касторная, 1999; М.Н. Касторная, Е.Н.Афанасьев, И.С. Тюменцева, 2000; Е.Н. Афанасьев, 2000).

В работе (М.Н. Касторная, 2003) были разработаны оптимальные условия сочетанных методов детекции возбудителей особо опасных инфекций, в частности, бруцеллеза на основе магноиммуносорбции – ПЦР - анализа и магноиммуносорбции – хемилюминесцентного иммунного анализа. Авторами работы показано, что выбор условий сочетанного применения избирательного концентрирования возбудителей бруцеллеза на магноиммуносорбенте с последующей постановкой ПЦР – анализа позволяет повысить чувствительность метода не менее чем в 1000 раз и сократить время проведения анализа до 3 часов.

Представленный выше анализ литературных данных дает возможность сделать заключение о высокой эффективности применения иммуносорбентов с магнитными свойствами для диагностики особо опасных инфекций, для индикации их возбудителей в объектах окружающей среды, в целом для решения задач эпизоотологического обследования природных очагов этих инфекций.

Успешное решение проблемы повышения специфичности, чувствительности, экспрессивности твердофазного иммуноанализа особо опасных инфекций возможно в направлении разработки новых органокремнеземных магносорбентов с количественной характеристикой магнитных свойств, обладающих простотой технологии получения с использованием отечественных реагентов, экономичностью, целенаправленностью специфических свойств.

## **Глава 2. Материалы и методы**

### **2.1. Характеристики используемых штаммов микроорганизмов**

Для выполнения исследований по конструированию диагностических тест-систем использованы штаммы микроорганизмов I-IV группы патогенности, основные характеристики которых представлены в таблице 1. Все штаммы микроорганизмов получены из коллекционного центра Ставропольского научно-исследовательского противочумного института.

### **2.2. Характеристики лабораторных животных**

В опытах использовали 50 белых мышей, массой 18-20г обоего пола и 10 кроликов породы «Шиншилла», массой 2,5-3кг. Животных получали из питомника Ставропольского научно-исследовательского противочумного института и после карантинизации использовали в опытах. В процессе содержания животных поддерживали рекомендуемый режим питания согласно приказу №1179 (М., 1983).

Все процедуры на экспериментальных животных, включая эвтаназию, проводили согласно методических рекомендаций (В.В. Карпенко, В.И. Сачкова, 1985; С.А. Куфлина, Т.Н. Павлова; 1985).

### **2.3. Способы получения антигенов чумы и выделения специфических иммуноглобулинов, получения иммунопероксидазных конъюгатов и их контроль в ИФА**

Выращивание чумного микроба проводили с использованием бульона Хоттингера рН 7,2-7,4, агара Хоттингера рН 7,2-7,4 (А.С. Лабинская, 1963). Стерилизацию биомассы осуществляли холодным (-40<sup>0</sup>С) ацетоном в течение 48 часов.

Контроль общей и специфической стерильности проводили биологическим и бактериологическим методами СП 1.2.011– 94 (Санитарные правила, 1994).

**Таблица 1. Характеристики штаммов микроорганизмов, использованных в работе**

№ п/п	Наименование и обозначение штамма	Характеристика штамма		
		Морфология и тинкториальные свойства	Культуральные свойства	Биохимические свойства
1	2	3	4	5
1	<i>Yersinia pestis</i> EV	Грамотрицательная палочка с закругленными концами, неподвижная, 1-2 мкм.	На агаре Хоттингера (рН 7,2±0,1) с сульфатом натрия при температуре 28±1 <sup>0</sup> С дает рост колоний через 1 сутки в виде «кружевных платочков» с шероховатым центром. На бульоне Хоттингера - в виде придонного хлопьевидного осадка.	Не разжижает желатину, не образует индола, ферментирует глюкозу с образованием кислоты, образует сероводород, ферментирует арабинозу и ксилозу, глицериннегативный штамм.
2	<i>Yersinia pestis</i> 461	Полиморфные овоидные биполярные палочки, грамотрицательные, неподвижные, образуют капсулу при температуре 37 <sup>0</sup> С.	На твердых питательных средах – типичные шероховатые колонии, на жидких питательных средах – бульон прозрачный, рыхлый осадок, хлопьевидная взвесь, нежная пленка.	Не разжижает желатину, не образует индола, ферментирует глюкозу с образованием кислоты, образует сероводород, ферментирует арабинозу и ксилозу.
3-5	<i>Yersinia enterocolitica</i> 64, 178, 383 (9)	Грамотрицательные, кокковидные палочки.	Через 24 часа роста на твердых питательных средах при температуре (24±1 <sup>0</sup> С) образуют мелкие колонии, которые увеличиваются в размерах через 2 суток.	Ферментируют арабинозу, сорбит, арабитол, арбутин, ксилозу; сероводород не образуют.
6 - 11	<i>Yersinia pseudotuberculosis</i> I-VI серотипов	Грамотрицательные, кокковидные палочки. Имеют жгутики и образуют капсулу.	На плотных средах образуют S- и R- колонии. Факультативные анаэробы. Оптимальная температура роста 30-35 <sup>0</sup> С.	Ферментируют арабинозу, адонит, арабитол, арбутин. Сероводород и индол не образуют. Нитраты не редуцируют.
12 - 14	<i>Escherichia coli</i> 0-10, 0-11, 0-18	Грамотрицательные, неподвижные палочки. Имеют выраженную капсулу, образуют слизистые колонии.	S-формы на агаре Хоттингера (7,2±0,1) единиц рН формируют опалово-мутноватые влажные, с ровным краем и блестящей поверхностью колонии. На жидкой питательной среде вызывают равномерное помутнение с образованием небольшого осадка.	Желатин не разжижают, образуют индол, сероводород, восстанавливают нитраты в нитриты, ферментируют лактозу с образованием кислоты и газа, глюкозу, мальтозу, манит, арабинозу, галактозу.

Фракцию 1 чумного микроба для экспериментальных исследований получали по E.E. Baker et al. (1952).

Водорастворимый белковый комплекс чумного микроба изолировали по схеме Е.Н.Афанасьева (2000):

### **I стадия. Фракционирование сернокислым аммонием**

Обеззараженную и проверенную на специфическую стерильность бактериальную массу *Y.pestis* E.V экстрагировали 2,5% раствором NaCl, после чего центрифугировали при 20000g в течение 30 минут на центрифуге « Vestan L – 75». Отделяли супернатант от осадка. Для фракционирования белков в супернатант добавляли сульфат аммония до 80% насыщения и перемешивали на магнитной мешалке в течение 30 минут. Полученный раствор оставляли на 16-18 часов при 4<sup>0</sup>C для формирования осадка и стабилизации белка. Центрифугировали при 20000g в течение 30 минут, супернатант удаляли, а осадок растворяли в 0,9% растворе хлорида натрия pH 7,2 в соотношении 1:1 и проводили диализ против водопроводной, а затем дистиллированной воды до отсутствия ионов NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, определяли реактивом Несслера.

### **II стадия. Механическая дезинтеграция**

Осадок, полученный после центрифугирования бактериальной массы и растворимый в 0,9% растворе хлорида натрия pH 7,2 в соотношении 1:1, в объеме 30 мл помещали в камеру дезинтегратора, предварительно охлажденного в течение 2 часов при температуре минус 40<sup>0</sup>C. Микробные клетки в дезинтеграторе замораживали при той же температуре в течение 8 часов. После этого проводили разрушение клеток на гидравлическом прессе, четырехкратно продавливая бакмассу через калиброванное отверстие патрона дезинтегратора. Далее биомассу размораживали и центрифугировали при 20000g в течение 30 минут.

### **III стадия. Ультразвуковая дезинтеграция**

Осадок, полученный после предыдущей стадии, суспендировали в 0,9% растворе хлорида натрия рН 7,2 в соотношении 1:1, добавляли детергент твин-80 до конечной концентрации 0,1% для улучшения солюбилизации белковых компонентов структур рибосом и мембран клеточных элементов. Полученную суспензию микробных клеток в объеме 30 мл помещали в дезинтегратор УЗДК – 2 Т и воздействовали ультразвуком в течение 20 минут при частоте 22 кГц. На заключительном этапе приготовления антигенного комплекса все полученные антигенные фракции смешивали.

### **Метод иммунизации животных и получение специфических сывороток**

Для иммунизации использовали кроликов породы «Шиншилла», весом 3–3,5 кг. Животных получали из питомника Ставропольского НИПЧИ и после карантина использовали в опытах.

Иммунизацию проводили по схеме, разработанной И.С. Тюменцевой с соавторами (И.С. Тюменцева, Е.В. Жданова, Е.Н. Афанасьева, 1994). В качестве иммунокорректора использовали феракрил (ФС 42-2742-90). Для получения высокоэффективных антител были подобраны оптимальные дозы антигена и сроки иммунизации животных. Известно, что сыворотки, полученные на ранних этапах иммунизации, обычно имеют более низкую аффинность, чем полученные позднее (Т.Р. Werblin, Tai Kim Young, G. W. Siskind, 1973). На аффинность антител влияет также величина дозы антигена, используемого для иммунизации. Иммунизация высокими дозами антигена не только вызывает продукцию низкоаффинных антител, но и приводит к образованию антител против посторонних примесей. Чтобы уменьшить нежелательный ответ на посторонние антигены, предпринята попытка вызвать к ним толерантность путем введения животным гомологичных антител (Р. Qold, S.O. Freedmmam, 1965) в период основного цикла иммунизации.

Титр антител в сыворотках определяли через 7 дней после последней иммунизации. Иммунологическую активность сыворотки определяли в реакции радиальной иммунодиффузии по Оухтерлони (O. Ouchterlony, 1949) или в реакции непрямой иммунофлуоресценции (РНИФ).

Если титр антител исследуемых сывороток в реакции преципитации составлял – 1:16–1:32, то проводили полное обескровливание животного. При низких значениях титра животных-продуцентов после месячного перерыва подвергали процедуре реиммунизации.

### **Методы контроля антигенов и сывороток**

Постановку реакции радиальной иммунодиффузии по Оухтерлони проводили по методике (O. Ouchterlony, 1949).

Для этого в чашках Петри с агаровым гелем равномерной толщины радиально вырезали лунки диаметром 3-4 мм на расстоянии 4-5 мм и вносили соответствующие растворы. При контроле титра чумного антигена центральную лунку заполняли чумной сывороткой в нативном состоянии с титром 1:16-1:32, остальные лунки заполняли антигеном чумным в разведениях от 1:2 до 1:64. Результат учитывали через 24 часа. Последнее разведение антигена, дающее преципитат, считали его титром. Титры чумного антигена составляли 1:32-1:64. При контроле титра сывороток центральную лунку заполняли соответствующим антигеном, а остальные лунки заполняли сыворотками, в разведениях от 1:2 до 1:64.

### **Постановка реакции непрямой иммунофлуоресценции**

Контроль титра сывороток определяли так же в РНИФ (А.С. Лабинская, 1963; Т.Н. Weller, А.Н. Coous, 1954).

Полученную чумную сыворотку разводили 1:10 в 0,9% растворе хлорида натрия рН 7,2 и титровали в этом же растворе двукратными разведениями до разведения 1:1280. На фиксированные мазки чумного микроба наносили различные разведения сывороток и инкубировали 15-20 мин во влажной камере при температуре  $(22\pm 4)^{\circ}\text{C}$ . Затем промывали препараты в 0,9% растворе хлорида натрия по 10 мин для удаления не



адсорбированных белков сыворотки, подсушивали на воздухе и на 20-30 мин наносили капли рабочего разведения люминесцирующей сыворотки против иммуноглобулинов кролика, далее препараты промывали и высушивали, как описано ранее. Готовые препараты изучали, предварительно нанеся на них каплю смеси глицерина (9 частей) и 0,9% раствор хлорида натрия (1 часть) (Н.А. Самойлова, В.Е. Рыженков, И.Я. Ямчков, 1999). Микроскопию препаратов осуществляли в падающем отраженном свете в люминесцентном микроскопе серии «Люмам», используя соответствующие фильтры согласно инструкции по эксплуатации прибора. За положительный результат принимали яркую (4+, 3+) флуоресценцию периферии микробных клеток. При исследовании полученных сывороток в РНИФ титр составлял не менее 1:800-1:1600.

#### **Выделение иммуноглобулинов путем фракционирования полиэтиленгликогелем**

Имуноглобулины из гипериммунных чумных сывороток выделяли по методу A. Polson et al. (A. Polson, Q.M. Potquier, I.E. Larquier, 1984) с помощью полиэтиленгликоля (ПЭГ). С этой целью смешивали равные количества иммунной сыворотки и 20% раствора ПЭГ pH 7,2. Раствор полиэтиленгликоля добавляли постепенно, перемешивали смесь на магнитной мешалке в течение 30 мин при температуре  $(22\pm 4)^{\circ}\text{C}$ . Оставляли смесь при  $4^{\circ}\text{C}$  в течение 18 часов для формирования осадка, затем центрифугировали при 6000g в течение 45 минут. Супернатант удаляли. Осадок ресуспендировали в дистиллированной воде pH 7,0 в объеме исходной сыворотки, вновь добавляли равный объем 20% ПЭГ и повторяли вышеуказанную процедуру. После центрифугирования супернатант удаляли, а осадок ресуспендировали в 0,1 М ФСБ pH 7,2 до исходного объема сыворотки. В полученный раствор вносили хлороформ до конечной концентрации 1% к общему объему, герметически закрывали и помещали на встряхиватель на 24 часа. Центрифугировали 45 минут при 6000g. Осадок удаляли, а супернатант, содержащий IgG, фильтровали через бумажный

фильтр. Выход IgG при таком методе выделения составлял 87-90% (S.P. Mayer, 1989). Концентрация белка полученных иммуноглобулинов чумных составила 15 мг/мл. Рабочий титр в РИД – 1:16-1:32, в РНИФ – 1:800-1:1600.

### **Получение иммунопероксидазных конъюгатов и их контроль в ИФА**

Иммунопероксидазные чумные конъюгаты получали методом периодатного окисления по методикам (Р.К. Nakane, А. Kawaoi, 1974). С этой целью использовали иммуноглобулины чумные, полученные по ранее описанной методике с рабочим титром в РИД 1:16-1:32.

Для конъюгации IgG с ферментом использовали пероксидазу хрена, тип VI, Rz 3.0 (Serva) с активностью 500 ед, которую в количестве 5 мг растворяли в 1 мл 0,3 М раствора натрия углекислого. Добавляли 0,025 мл 0,32% раствора формалина, перемешивали на магнитной мешалке в течение 30 минут. Добавляли 1 мл 0,04 М раствора периодата натрия и перемешивали, как ранее описано. По истечении времени инкубации добавляли 1 мл 0,16 М раствора этиленгликоля, перемешивали 1 час. Все перечисленные операции проводили при температуре  $(22\pm 4)^{\circ}\text{C}$ . Затем раствор диализовали против 0,01 М карбонат бикарбонатного буферного раствора pH 9,5 при  $4^{\circ}\text{C}$  в течение 18 часов. Раствор переносили во флакон, добавляли 1 мл иммуноглобулинов чумных с концентрацией 10 мг/мл, перемешивали 2 часа при температуре  $(22\pm 4)^{\circ}\text{C}$ . Добавляли 5 мг боргидрида натрия, оставляли без перемешивания на 2 часа при  $4^{\circ}\text{C}$ . Раствор диализовали против 0,1 М ФСВ pH 7,2 в течение 18 часов при  $4^{\circ}\text{C}$ . Затем раствор наносили на хроматографическую колонку с сефадексом G-100, уравновешенную 0,1 М ФСВ pH 7,2. Элюировали тем же буферным раствором при  $4^{\circ}\text{C}$ , собирали фракции по 3 мл. Каждую фракцию фотометрировали при длине волны 280 нм и 403 нм. Отбирали фракции, у которых отношение экстинций 403/280 нм (Rz) было 0,35-0,55. Во фракции

добавляли бычий сывороточный альбумин 10 мг на 1 мл. Фракции разливали в ампулы по 0,2 мл и лиофилизировали.

Рабочий титр иммунопероксидазного конъюгата чумного определяли методом двойного антительного «сэндвича» по методике (Н.Ф. Василенко, Л.И. Заревина, А.И. Мирошниченко, О.Н. Лопаткин, Г.И. Башкова, 1988). В работе использовали полистироловые планшеты для иммунологических реакций Московского опытного экспериментального завода.

Планшеты сенсibiliзировали иммуноглобулинами чумными, полученными по ранее описанной методике, в концентрации 100 мкг/мл в объеме 0,1 мл ФСБ pH 7,4, инкубировали 3 часа при температуре 37<sup>0</sup>С. Несорбированные иммуноглобулины удаляли, в лунки вносили по 0,1 мл 1% бычьего сывороточного альбумина, инкубировали 1 час при 37<sup>0</sup>С. После удаления в лунки вносили по 0,1 мл чумного антигена, полученного по ранее описанной методике, с концентрацией белка 0,1 мг/мл, инкубировали 1 час при температуре 37<sup>0</sup>С. Несвязавшиеся антигены удаляли, планшеты промывали 5-кратно по 3-4 мин 0,05% раствором твин-20 в ФСБ и просушивали. Затем вносили по 0,1 мл разведенного пероксидазного конъюгата от 1:100 до 1:800 и инкубировали 1 час при температуре 37<sup>0</sup>С. После промывки добавляли по 0,1 мл свежеприготовленного субстрат-индикаторного раствора (0,1 М лимонная кислота с 0,2 М раствором натрия фосфорнокислого однозамещенного pH 5,0 в присутствии 0,006% перекиси водорода и ортофенилендиамина в концентрации 0,4 мг/л) и инкубировали 10 мин при температуре (22±4)<sup>0</sup>С без доступа света. Для остановки реакции использовали 0,2 М раствор серной кислоты.

Результаты реакции учитывали визуально и на анализаторе колориметрическом иммуноферментном АКИ-Ц – 0,1 при длине волны 492 нм путем определения оптической плотности проб, находящихся в лунках планшета. Рабочий титр иммунопероксидазных чумных конъюгатов составил 1:200 – 1:400.

## **2.4. Материалы для синтеза композиционных кремнеземных сорбентов и физико-химические методы их исследования**

При исследованиях использовали аэросил А-380 (ГОСТ 14922-77, х.ч.), с содержанием основного вещества  $\text{SiO}_2$  – 99%. Данный кремнеземный сорбент представляет собой продукт высокотемпературного парофазного гидролиза четыреххлористого кремния в токе кислорода с последующей конденсацией в парах воды. Аэросил – это непористый кремнезем, имеющий форму частиц, которая близка к сферической. В качестве объекта для сравнения структуры использованы образцы макропористого кремнезема силохром С-120, а также аэросилогель, полученный на основе аэросила А-380.

### **Характеристики кремнеземных сорбентов представлены в табл. 2.**

В качестве модификаторов сорбентов использовали следующие вещества: хитозан – полностью дезацетилованный продукт – поли [(1-4) – 2 –амино – 2-дезоксид – – D – глюкозы], полученный на заводе им. Войкова (г. Москва), молекулярной массой  $M_w = 200000$ , степенью дезацетилирования 0,8 и степенью кристалличности 75%.

В экспериментальных исследованиях были использованы хлориды титана, алюминия, циркония марки о.с.ч., а также пероксид водорода, азотная, соляная, серная и уксусная кислоты марки х.ч.

Удельную поверхность сорбентов определяли по низкотемпературной адсорбции азота, используя методику Клячко–Гурвича (А.А. Клячко–Гурвича, 1961), а объем пор и их распределение по размерам – методом ртутной порометрии (Т.Г. Плаченков, 1965).

### **2.4.1. Химический анализ элементоксидных слоев сорбентов**

#### Определение титана

В ходе анализа навеску титаносодержащего кремнеземного сорбента массой 0,1–0,15 г помещали в колбу на 25 мл, приливали 5 мл концентрированной  $\text{H}_2\text{SO}_4$  и нагревали на водяной бане в течение 3 часов. Далее раствор сливали в мерную колбу на 25 мл, навеску сорбента

промывали небольшими порциями дистиллированной воды, которую переносили в ту же колбу, затем добавляли 3 мл 3%-ного пероксида водорода и доводили объем раствора до метки дистиллированной водой. Измеряли оптическую плотность раствора при 410 нм на спектрофотометре СФ–46 и определяли содержание титана в мг-экв/г по калибровочному графику в соответствии с методикой, описанной в работе (А.П. Нечипоренко, Г.К. Шевченко, С.И. Кольцов, 1981).

#### Определение алюминия

Количественное определение алюминия в составе сорбентов проводили спектрофотометрическим методом на приборе СФ–46, основанном на измерении оптической плотности сернокислого раствора алюминия с красителем алюмином. Извлечение данного химического элемента и контроль осуществляли по методике, предложенной в работе (А.П. Нечипоренко, Г.К. Шевченко, С.И. Кольцов, 1981).

#### Определение циркония

Содержание циркония в образцах сорбентов определяли спектрофотометрическим методом на приборе СФ–46, измеряя при 540 нм оптическую плотность раствора, содержащего комплекс циркония с красителем 2,4–(пиридилазо) – резорцином по методике (А.П. Нечипоренко, Г.К. Шевченко, С.И. Кольцов, 1981).

#### Методика определения гидроксильных групп кремнеземных сорбентов

Определение гидроксильных групп в исходном аэросиле А-380 и образцах пористых кремнеземов проводили с применением реактива Гриньяра. В основе метода определения гидроксильных групп использована их способность к взаимодействию с соединением  $\text{CH}_3\text{MgI}$  с выделением метана. Данный метод ранее был применен для определения гидроксильных групп в образцах силохромов и силикагелей (С.И. Кольцов, Г.Н. Кузнецова, В.Б. Алесковский, 1967).

**Таблица 2. Характеристики кремнеземных сорбентов**

Наименование сорбента	Содержание		Удельная поверхность, S, м <sup>2</sup> /г	Размер пор, d, нм	Объем пор, V, см <sup>3</sup> /г	Тип структуры
	SiO <sub>2</sub> , %	-ОН групп, мг-экв./г				
Аэросил А-380	99,9	1,95	380	-	-	Аморфная
Силохром С-120	99,8	1,28	127	40	1,46	Аморфно-глобулярная
Аэросилогель	99,8	1,45	140	36	1,44	Аморфно-глобулярная

## **2.4.2. Физико-химические методы исследования**

### Электронная микроскопия сорбентов

Микроструктуру сорбентов исследовали на сканирующем электронном микроскопе IMZ – Т3000 при ускоряющем напряжении 15 кВ, разрешении  $70 \text{ \AA}^0$  и увеличении в 10000 раз. Навески сорбентов по 20 мг помещали в специальный держатель из латуни, покрытый слоем графита. Затем образец вводили в вакуумный пост прибора и на поверхность наносили слой никеля толщиной  $80\text{--}100 \text{ \AA}^0$ , после этого проводили исследования микроструктуры как описано в работе (Я. Фрайфельдер, 1980).

### Электронная спектроскопия сорбентов в УФ – области

Исследование сорбентов проводили методом спектроскопии в отраженном диффузно – рассеянном свете относительно стандарта MgO на приборе AQV – 50 "Shimadzu" в диапазоне 290-700 нм (Г.Г. Русин, 1990).

### ИК – спектроскопия

ИК– спектры сорбентов исследованы на спектрофотометре Specord-75 IR (Германия) в диапазоне волновых чисел  $500\text{--}4000 \text{ см}^{-1}$ . Из образцов исследуемых сорбентов и наполнителя бромистого калия прессованием получали прозрачные однородные таблетки, которые далее использовали в ИК– спектроскопии. Идентификацию поверхностных функциональных групп сорбентов проводили, используя корреляционную диаграмму отнесения полос поглощения основных групп и связей (А.В. Киселев, 1972).

## **2.5. Сублимация биопрепаратов**

Препараты (антигены, иммунные сыворотки, иммуноглобулины, конъюгаты, вакцина *Y. pestis* EV), разлитые в ампулы, замораживали в морозильном столе HC 700/50 «Friger» (ЧССР) до температуры  $-40^{\circ}\text{C}$  и выдерживали в течение 16-18 часов. Перед загрузкой ампул в лиофильную

установку (TG-S Германия) температуру десублиматора доводили до  $-70^{\circ}\text{C}$ . В камеру загружали ампулы, герметизировали, устанавливали рабочее давление 10-30 Па. Препараты высушивали до температуры  $(28\pm 1^{\circ}\text{C})$ , выдерживали при этой температуре 3-4 часа, что позволяло достичь величину потери массы при высушивании 2-4%. Время лиофилизации  $(18\pm 2)$  часа. Ампулы с препаратами запаивали на газокислородной горелке и хранили при температуре  $4-6^{\circ}\text{C}$ . По внешнему виду лиофилизированные препараты имели вид пористой таблетки без признаков микрооттаивания.

## 2.6. Статистическая обработка результатов исследований

С целью подтверждения достоверности и воспроизводимости результатов, полученных при экспериментальных исследованиях, применяли математические методы (Т.Н. Зайцев, 1991).

Обработку результатов экспериментов проводили на компьютере "Pentium-3". Для расчета средней квадратичной ошибки отдельного измерения (S), выборочной дисперсии, вероятного квадратичного отклонения среднеарифметического ( $E_{0,95}$ ) использованы ниже приведенные формулы:

(1)

где:  $C_i$  – единичное измерение;  $C$  – среднее арифметическое из всех измерений;  $f$  – число степеней свободы, показывает число вероятных измерений, которые соответствуют первому результату.

Доверительный интервал среднего арифметического зависит от степени свободы  $f$  и вычислен по формуле:

$$E = \frac{t \times S}{n} \quad (2)$$

где:  $S$  – число параллельных определений;  $n$  – число параллельных определений;  $t$  – критерий Стьюдента.



## **Глава 3. Синтез композиционных магноиммуносорбентов и исследование их свойств**

### **3.1. Синтез хитозанкремнеземных и элементсодержащих композиционных магносорбентов**

Анализ данных литературы, который представлен в 1 главе, свидетельствует о том, что оптимизация состава и структуры твердого носителя является одним из важнейших факторов, способствующим повышению экспрессности и чувствительности метода количественного твердофазного иммунохимического анализа микроорганизмов.

Целью данного раздела является получение ферромагнитных сорбентов, обладающих заданным составом, адсорбционными и магнитными свойствами, которые могут быть использованы для проведения иммуноанализов микроорганизмов. Одной из задач исследований также является исследование магнитоуправляемых сорбционных материалов для глубинного культивирования вакцинного штамма чумного микроба.

Синтез магносорбентов с высокой сорбционной активностью осуществлен методом формирования пористой структуры носителя в присутствии органических полимеров в соответствии с принципами, сформулированными в работе А.В. Брыкалова (1993).

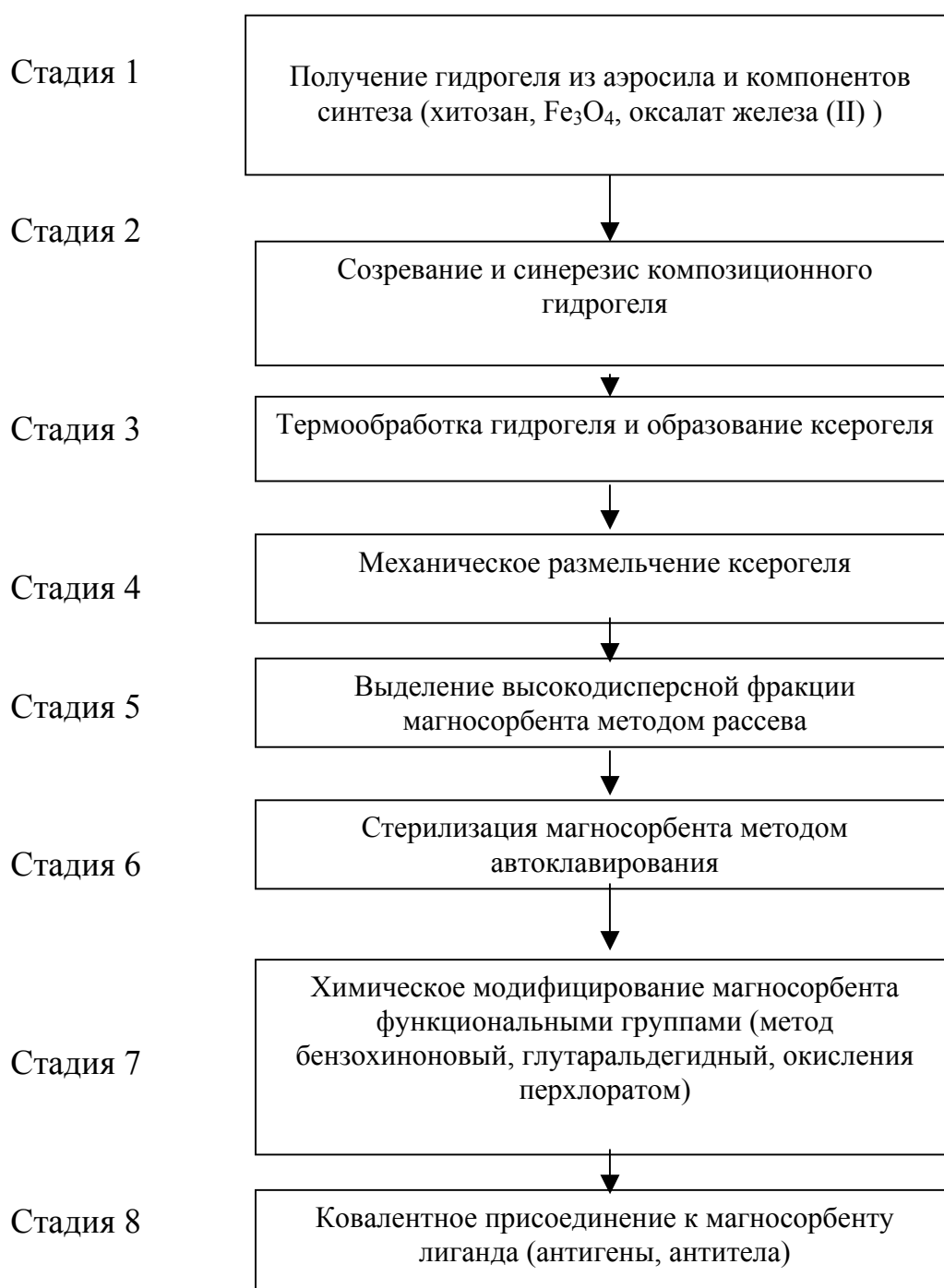
Кремнезем-аэросил А-380, характеристики которого предоставлены в главе 2, использован в качестве структурного компонента, формирующего остов композиционного сорбционного материала.

В качестве органических компонентов синтеза использован 3% раствор хитозана в 3% уксусной кислоте. В качестве магнитного компонента при синтезе применяли магнетит ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ), а также разработан способ получения магносорбентов путем введения на стадии получения гидрогеля оксалата железа (II).

Схема получения магноиммуносорбентов включает 8 стадий и представлена ниже (рисунок 1).

Стадии 1-3 характеризуют процесс синтеза магносорбентов на основе формирования пористой структуры органокремнеземной матрицы в присутствии компонентов синтеза.

На стадии I за счет протекающих процессов конденсации с участием силанольных групп кремнезема – аэросила образуется гидрогель. На стадии 2 при созревании и синерезисе гидрогеля протекают дегидратационные процессы, что приводит к уменьшению объема гидрогеля, его уплотнению.



**Рисунок 1. Схема получения магноиммуносорбентов**

На стадии 3 при термообработке гидрогель превращается в ксерогель, при этом объем его уменьшается в 8–15 раз благодаря действию капиллярных сил. На стадиях 4–8 завершается процесс синтеза композиционных магносорбентов, обеспечивающий выделение высокодисперсной фракции, получение стерильного сорбционного материала, а также его активирование функциональными группами с последующей иммобилизацией лигандов.

Структура композиционных сорбентов представлена корпускулярной системой, которая состоит из частиц кремнезема, покрытых полимером хитозаном. Размер корпускул определяет величину удельной поверхности, а плотность их упаковки - объем и радиус пор. Механизм образования пористых хитозанкремнеземных магносорбентов можно представить как сложный процесс, сопровождающийся формированием корпускулярной структуры кремнеземного остова из непористых частиц аэросила А–380 и включением в него органического полимера хитозана и магнетита. Рассмотренный механизм образования композиционных сорбентов согласуется с данными литературы по получению органокремнеземных сорбентов для аффинной хроматографии и носителей для иммобилизации ферментов (А.В. Брыкалов, 1993).

Получение магносорбентов проводили разработанными нами двумя методами (И.С. Тюменцева, Д.А. Грядских, 2002; Д.А. Грядских, 2002; Д.А. Грядских, И.С. Тюменцева, Е.Н. Афанасьев, 2003).

По первому методу на первой стадии синтеза сорбента использовали готовый магнетит. Для этого к 5г аэросила А–380 добавляли 3% раствор хитозана в 3% уксусной кислоте и магнетит в количестве 0,5–3г. Полученный продукт подвергали гелеобразованию в течение 4 часов при 22°C, предварительно поместив гидрогель в кварцевые кюветы. Затем полученный продукт высушивали до образования ксерогеля в течение 2 часов при температуре 95-105°C, измельчали, а затем методом рассева выделяли фракции размером частиц 70–150 мкм.

По второму методу на первой стадии синтеза использовали оксалат железа. Для этого к 5г аэросила А–380 добавляли 3% раствор хитозана в 3% уксусной кислоте и далее оксалат железа в количестве 1,5–3г. Процесс синтеза сорбентов затем проводили по схеме получения магносорбентов, приведенной ранее (рисунок 1). Отличие в том, что на стадии 3 термообработку гидрогеля и высушивание ксерогеля проводили при температуре 180°C. При этом происходит разложение оксалата железа до FeO, далее образование Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> и получение магнетита Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>.

Проведены исследования структурных характеристик магносорбентов. Методом, основанным на низкотемпературной сорбции азота, была определена удельная поверхность сорбционных материалов. Суммарный объем пор и диаметр пор определены методом ртутной порометрии на приборе АУТО PORE 9200.

В таблице 3 представлены структурные характеристики сорбентов, полученные методом формирования пористой структуры кремнеземной матрицы в присутствии органического полимера хитозана и использовании магнетита.

**Таблица 3. Характеристики магносорбентов в зависимости от количества магнетита, используемого в синтезе**

Наименование образца	Массовое соотношение компонентов синтеза			Время гелеобразования, ч	Удельная поверхность, м <sup>2</sup> /г	Объем пор, см <sup>3</sup> /г	Диаметр пор, нм
	SiO <sub>2</sub>	Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	Хитозан				
МХКС <sub>2,5</sub>	5	2,5	1,5	4	68	1,5	35
МХКС <sub>1,5</sub>	5	1,5	1,5	4	74	1,4	32
МХКС <sub>0,5</sub>	5	0,5	1,5	4	82	1,2	26

Результаты, представленные в таблице 3, показывают, что при увеличении количества магнетита, вводимого в компонентный состав

сорбента, наблюдается некоторое снижение величины удельной поверхности сорбентов и увеличение объема пор.

В таблице 4 представлены структурные характеристики хитозанкремнеземных магносорбентов, полученных методом формирования пористой структуры кремнеземной матрицы в присутствии полимера хитозана и оксалата железа.

**Таблица 4. Характеристики магносорбентов в зависимости от количества оксалата железа, используемого в синтезе**

Наименование образца	Массовое соотношение компонентов синтеза			Время гелеобразования, ч	Удельная поверхность, м <sup>2</sup> /г	Объем пор, см <sup>3</sup> /г	Диаметр пор, нм
	SiO <sub>2</sub>	Хитозан	Оксалат железа				
МХКС <sub>3</sub>	5	1,5	3	4	70	1,63	37
МХКС <sub>2,5</sub>	5	1,5	2,5	4	73	1,55	34
МХКС <sub>2</sub>	5	1,5	2	4	78	1,35	30

При сравнительном анализе данных таблиц 3 и 4 следует отметить, что с использованием в качестве компонента для синтеза сорбентов оксалата железа получаемые магносорбенты имеют несколько меньшую удельную поверхность и большее значение объема пор. Это объясняется, по-видимому, разрыхляющим и активирующим влиянием газообразных продуктов, выделяющихся при разложении оксалата железа, с образованием FeO, далее Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> и магнетита.

В последующем проведены исследования по количественной оценке магнитных свойств разработанных композиционных магносорбентов. При этом использовали вибрационный метод. Для определения магнитных свойств сорбент закреплялся на конце тонкого стержня из немагнитного материала, который с помощью цангового зажима соединялся с вибрационной системой, приводящей образец в колебательное движение. Образец магносорбента располагался между четырьмя измерительными

катушками, которые неподвижно закреплялись на полюсах электромагнита. Магнитный момент сорбента определяли по магнитному моменту эталонной пластинки из никеля.

Расчет удельной намагниченности проводили по следующей формуле:

$$M_{уд.} = \frac{E_{обр.} \times m_{эт.}}{E_{эт.} \times m_{обр.}} \quad (3)$$

где  $E_{эт.}$ ,  $m_{эт.}$  - ЭДС и масса эталона;  
 $E_{обр.}$ ,  $m_{обр.}$  - ЭДС и масса сорбента

Результаты проведенных исследований представлены в таблице 5.

**Таблица 5. Магнитные свойства хитозанкремнеземных магносорбентов**

Наименование образца	Массовое соотношение компонентов синтеза			Удельная поверхность, м <sup>2</sup> /г	Удельная намагниченность насыщения, МН, А х м <sup>2</sup> /кг
	SiO <sub>2</sub>	Хитозан	Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub>		
МХКС <sub>2,5</sub>	5	1,5	2,5	68	17,4
МХКС <sub>1,5</sub>	5	1,5	1,5	74	10,2
МХКС <sub>0,5</sub>	5	1,5	0,5	82	4,3

Результаты исследований, представленные в таблице 5, свидетельствуют, что величина удельной намагниченности насыщения возрастает с увеличением содержания магнетита в составе композиционных хитозанкремнеземных сорбентов.

На сканирующем электронном микроскопе IMZ–Т3000 проведены исследования микроструктуры полученных композиционных магносорбентов по сравнению с известными кремнеземными материалами, такими как макропористое стекло МПС 200 ВГХ, силохром С–120 и гидротермальный силохром по методике, представленной в разделе «Материалы и методы». При этом сорбент помещали в специальный держатель из латуни, покрытый слоем графита. Затем образец вводили в вакуумный пост прибора и на поверхность наносили слой никеля толщиной 80–100А<sup>0</sup>. На рисунке 2 представлены фотографии микроструктур

композиционного хитозанкремнеземного сорбента в сравнении с силохромом С–120. Для силохрома С–120 характерна однородная глобулярная структура с размером сросшихся корпускулярных частиц оксида кремния около 20 нм. В отличие от силохрома, топография поверхности макропористого стекла представлена губчатой структурой (рисунок 3). Измененную глобулярную структуру имеет композиционный хитозанкремнеземный сорбент. Особенностью его структуры является сочетание обширных участков аморфных образований с губчатой структурой.

1

2

**Рисунок 2. Электронная микроскопия**

1- композиционный хитозанкремнеземный магносорбент (МХКС<sub>1,5</sub>)

2- силохром С-120

Увеличение x10000

1

2

**Рисунок 3. Электронная микроскопия**

1. - макропористое стекло МПС 2000 ВГХ

2. - гидротермальный силохром С-120

Увеличение x10000



На приборе AQY-50 “Shimadzu” выполнены исследования по спектрам диффузного отражения композиционных хитозанкремнеземных магносорбентов в сравнении с аэросилом А-380 и аэросилогелем на основе данного аэросила (рисунок 4,5). Установлено, что близкие спектры диффузного отражения в диапазоне 550–700 нм имеют магнетит и композиционный сорбент, содержащий 50% магнетита. С уменьшением содержания магнетита в составе магносорбента наблюдается закономерное уменьшение поглощения в спектральной области 350–660 нм. По сравнению с аэросилом и с аэрогелем увеличение количества хитозана и магнетита в составе композиционных сорбентов приводит к разному увеличению поглощения.

Полученные данные по спектрам диффузного отражения могут быть использованы для оптимизации условий синтеза композиционных сорбентов, а также их идентификации, количественного определения содержания полимера хитозана в сорбционном материале.

Разработана технология получения элементсодержащих кремнеземных сорбентов на основе аэросила А-380 методом деструкционно-эпитаксиального осаждения (ДЭО), ранее используемого для модифицирования силикагеля такими химическими элементами, как медь, цинк, кобальт, магний, марганец (В.Б. Алесковский, 2001).

Для синтеза элементсодержащих кремнеземных сорбентов к 4 г аэросила А-380 добавляли 100 мл 0,15 М растворов соответствующих для каждого отдельного синтеза солей  $\text{CuSO}_4$ ,  $\text{MgSO}_4$ ,  $\text{CoSO}_4$ ,  $\text{MnSO}_4$ ,  $\text{FeCl}_2$  в 0,25М растворе водного аммиака. Суспензию выдерживали в течение 24 часов при 230°C. Далее сорбент отмывали дистиллированной водой до нейтральной реакции в промывных водах, высушивали при температуре 95-110°C в течение 2 часов. Затем сорбент измельчали и методом рассева выделяли фракцию с размером частиц 80–120 мкм.

**Рисунок 4. Спектры диффузного отражения сорбентов**

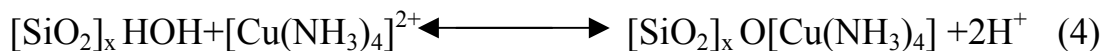
1. - аэросил А–380
2. - аэросилогель на основе аэросила А–380
3. - хитозан
4. - хитозанкремнеземный сорбент (ХКС<sub>1,5</sub>)
5. - хитозанкремнеземный сорбент (ХКС<sub>0,75</sub>)
6. - хитозанкремнеземный сорбент (ХКС<sub>0,39</sub>)

Количественный химический анализ полученных сорбентов подтвердил образование поликремневых солей химических элементов, таких как медь, магний, марганец, кобальт, и процесс образования модифицированных кремнеземов согласуется с механизмом, предложенным в работе В.Б. Алесковского (2001).

#### **Рисунок 5. Спектры диффузного отражения сорбентов**

1. - магнетит  $\text{Fe}_3\text{O}_4$
2. - магнитоуправляемый хитозанкремнеземный сорбент (МХКС<sub>2,5</sub>)
3. - магнитоуправляемый хитозанкремнеземный сорбент (МХКС<sub>1,25</sub>)
4. - магнитоуправляемый хитозанкремнеземный сорбент (МХКС<sub>0,5</sub>)
5. - магнитоуправляемый хитозанкремнеземный сорбент (МХКС<sub>0,25</sub>)

Так, при контакте кремнезема с аммиачным раствором сульфата меди происходит ионный обмен: протоны гидроксильных групп кремнезема замещаются комплексными ионами в соответствии с уравнением химической реакции:



Далее происходит гидролиз сорбированного аммиаката меди:



В аммиачном растворе растворимость кремнезема увеличивается и при этом накапливается растворенная кремниевая кислота. В растворе, содержащем ионы меди и кремниевую кислоту, образуется силикат меди.



Как известно, силикат меди - трудно растворимое соединение и в процессе превращений на поверхности кремнезема начинается его осаждение, что в целом включает процесс деструкционно-эпитаксиального осаждения. При высушивании сорбента с использованием в качестве основы для синтеза непористого аэросила А-380 протекает сложный процесс образования аморфно-корпускулярной структуры за счет конденсационных процессов с участием гидроксильных групп кремнезема.

В таблице 6 представлены структурные характеристики и содержание некоторых химических элементов в составе сорбционных материалов.

**Таблица 6. Характеристика сорбентов**

Сорбенты	Удельная поверхность, м <sup>2</sup> /г	Суммарный объем пор, см <sup>3</sup> /г	Содержание химических элементов, мг-ион/г SiO <sub>2</sub>					
			Cu	Mg	Ca	Co	Mn	Fe
Аэросилогель–Co	170	1,35	-	-	-	1,15	-	-
Аэросилогель–Cu	164	1,40	1,2	-	-	-	-	-
Аэросилогель–Mg	175	1,30	-	1,13	-	-	-	-
Аэросилогель–Ca	150	1,50	-	-	1,1	-	-	-
Аэросилогель–Mn	160	1,42	-	-	-	-	1,1	-
Аэросилогель–Fe	153	1,40						1,1

Данные таблицы 6 свидетельствуют о том, что хотя синтез элементсодержащих кремнеземных сорбентов протекает в присутствии разных по химическому составу веществ, однако при этом проявляется общая закономерность в формировании пористой структуры.

Спектры диффузного отражения элементсодержащих образцов кремнеземов, выполненные на спектрофотометре AQV-50 “Shimadzu” с интегрирующей сферой относительно непоглощающего стандарта MgO, представлены на (рисунок 6).

Наиболее активное влияние химического модифицирования кремнеземного сорбента проявилось в спектральной области 250–400 нм. Спектр диффузного отражения кремнеземов, имеющих в составе кальций и магний, близки к спектру аэросила А-380. Хромофорные металлы, содержащиеся в элементсодержащих кремнеземах, приводят к резкому увеличению поглощения в спектральной области 250–400 нм, причем кобальт и марганец дают широкую полосу поглощения, а медь способствует сдвигу полосы поглощения в коротковолновую область. Полученные результаты по спектрам диффузного отражения, на наш взгляд, можно использовать для оптимизации условий синтеза элементсодержащих сорбентов, их идентификации.

Таким образом, нами разработан синтез элементсодержащих сорбентов с магнитным компонентом—магнетитом. Технология получения магносорбентов соответствует приведенной ранее, с тем лишь отличием, что на начальном этапе включают введение магнетита в количестве от 0,5 до 2,5 г.

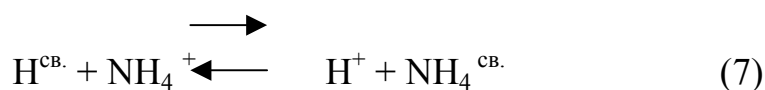
#### **Рисунок 6. Спектры диффузного отражения сорбентов**

1. - аэросилогель Са; 2.- аэросилогель Mg; 3. - аэросилогель Cu;
4. - аэросилогель Со; 5. - аэросилогель Mn; 6. - аэросилогель А-380

Проведены исследования кислотных свойств поверхности композиционных сорбентов, полученных методом формирования пористой структуры кремнеземной матрицы в присутствии полимера хитозана, а также элементсодержащих сорбентов, синтезированных методом деструкционно-эпитаксиального осаждения.

Для определения Бренстедовских кислотных центров модифицированных композиционных сорбентов применяли метод ионообменной адсорбции в водном растворе (А.В. Брыкалов, С.И. Кольцов, В.И. Ковальков и др., 1986).

В качестве химического вещества – зонда для определения кислотных свойств сорбентов использовали титрованный раствор 0,13М ацетата аммония, ионный обмен которого с поверхностью сорбентов осуществлялся по следующей схеме:



где  $\text{H}^+$ ,  $\text{NH}_4^+$  – ионы в растворе;

$\text{H}^{\text{св.}}$ ,  $\text{NH}_4^{\text{св.}}$  – ионы, связанные с поверхностными центрами сорбента

Для проведения исследований брали 4 навески сорбента массой 0,1; 0,3; 0,5 и 1 г, помещали в плоскодонные колбы на 50 мл и добавляли в каждую по 25 мл 0,13М  $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ , плотно закрывали колбы пробками. Содержимое инкубировали при температуре 24°C в течение 24 часа. Далее надосадочную жидкость декантировали в химический стакан на 50 мл и измеряли рН раствора на иономере универсальном ЭВ–74.

Расчет концентрации бренстедовских кислотных центров  $B_0$  проводили по формуле:

$$B_0 = \frac{C_x \times 25}{P \times S} \quad (8)$$

где:  $C_x$  – концентрация уксусной кислоты, образовавшейся при взаимодействии ацетата аммония с кислотными центрами сорбента в мг-экв/мл;

$P$  – навеска образца в г;  $S$  – удельная поверхность образца в м<sup>2</sup>/г.

Поскольку между ионами  $H^+$  и  $NH_4^+$  в растворе и ионами  $H^{CB}$  и  $NH^{CB}_4$ , адсорбированными поверхностными центрами сорбентов, существует динамическое равновесие, были рассчитаны константы равновесия  $K_{cp}$ , позволяющие оценивать относительную силу кислотных центров:

$$K_{cp} = \frac{[H^+] \times [NH_4^+]}{[H^{CB}] \times [NH_4^{CB}]} \quad (9)$$

В приведенной формуле величина концентрации ионов  $[H^+]$  соответствует величине измеряемых значений рН раствора ацетата аммония, в котором находится исследуемый образец сорбента;  $[H^{CB}]$  – равна разности общей концентрации кислотных центров и  $[NH^{CB}_4]$ ;  $[NH_4^+]$  – находят из концентрации ионов  $[NH_4^+]$  в исходном растворе ацетата аммония за вычетом концентрации  $[NH^{CB}_4]$ ,  $[NH^{CB}_4]$  – соответствует значению концентрации уксусной кислоты, образовавшейся при взаимодействии ацетата аммония с сорбентами.

В таблицах 7 и 8 представлены данные концентрации брэнстедовских кислотных центров и констант равновесия  $K_{cp}$  для образцов сорбентов, полученных методом формирования пористой структуры кремнезема в присутствии полимеров декстрана и хитозана, а также элементсодержащих сорбентов, синтезированных методом деструкционно-эпитаксиального осаждения.

Из данных таблицы 7 видно, что композиционные органо-кремнеземные сорбенты, по сравнению с исходным аэросилом А-380, имеют меньшие значения концентрации протонодонорных кислотных центров  $B_0$  и констант равновесия. Данную закономерность можно объяснить тем, что при синтезе органокремнеземных сорбентов в процессе формирования корпускулярной структуры полимеры декстран и хитозан частично экранируют Брэнстедовские центры кремнеземной матрицы.



**Таблица 7. Расчет концентрации Бренстедовских кислотных центров в мг-экв/м<sup>2</sup>, констант равновесия  $K_{cp}$  для композиционных сорбентов**

Навеска сорбента	$[NH_4^c] \times 10^{-3}$	$[H^+] \times 10^{-3}$	$[H^6] \times 10^{-3}$	$[NH_4^+] \times 10^{-3}$	$B_0 \times 10^{-3}$ мг-экв/м <sup>2</sup>	$K_{cp} \times 10^{-5}$
Аэросил А-380						
0,1003	0,9	5,62	-	-		
0,3000	1,0	5,89	3,2	126,1	1,1	1,02
0,5010	1,1	6,16	5,9	125,8		
1,0007	1,5	7,94	12,5	124,1		
*ДКС						
0,1005	0,5	1,32	-	-		
0,3012	0,9	1,82	1,5	131,1	0,83	0,72
0,5002	1,1	2,19	2,9	130,9		
1,0020	1,8	3,39	6,19	130,2		
*ХКС						
0,1001	0,4	1,17	-	-		
0,3004	0,5	1,35	1,55	131,5	0,72	0,44
0,5010	0,7	1,58	2,79	131,3		
1,005	0,9	2,0	6,09	131,1		

\*ДКС – декстранокремнеземный сорбент

\*ХКС – хитозанкремнеземный сорбент

При синтезе композиционных сорбентов, содержащих  $Fe_2O_3$ , вводимый до массового количества 15% относительно общей массы получаемого композиционного сорбента, наблюдается усиление кислотных свойств поверхностных центров модифицированных кремнеземов (таблица 8). Кроме того введение в состав композиционного сорбента  $Fe_2O_3$  приводит к уменьшению на 25-30% удельной поверхности сорбентов, что, вероятно, обусловлено стабилизирующим действием оксида железа (II),

проявляющимся в противодействии процессу, связанному с укрупнением корпускулярных частиц в структуре модифицированного кремнезема.

В таблице 8 представлены данные по кислотным свойствам элемент-кремнеземных сорбентов, полученных методом деструкционно-эпитаксиального осаждения содержащих медь-, кобальт-, железооксидные слои.

**Таблица 8. Расчет концентрации Бренстедовских кислотных центров и констант равновесия ионного обмена для сорбентов**

№ п/п	Наименование сорбента	$V_0 \times 10^{-3}$ мг-экв/м <sup>2</sup>	$K_{cp.} \times 10^{-5}$
1.	Аэросил А-380	1,1	1,02
2.	Аэросилогель СО	0,74	0,63
3.	Аэросилогель Fe	0,78	0,71
4.	Аэросилогель Al	1,2	1,12
5.	Аэросилогель Си	0,64	0,7
6.	*ФХКС	1,2	0,84

\*ФХКС – феррохитозанокремнеземный сорбент

Синтез элементсодержащих кремнеземных сорбентов методом деструкционно-эпитаксиального осаждения, в отличие от общеизвестных методов синтеза твердых веществ, протекает не путем хаотичного междуатомного и межмолекулярного взаимодействия, а путем переноса и закрепления на заранее подготовленной поверхности каждый раз только одних, избранных структурных единиц. Данным методом по оригинальному синтезу получены магносорбенты, обладающие магнитными свойствами.

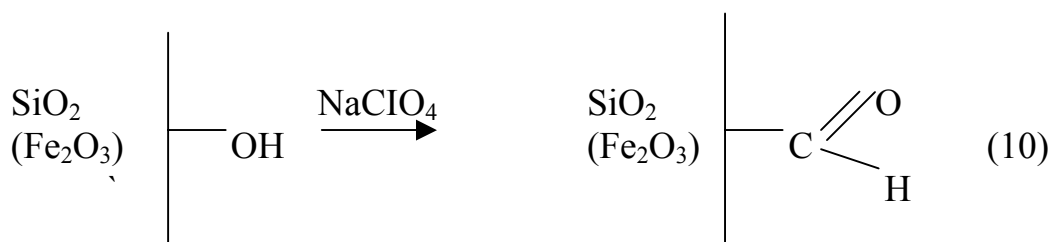
Таким образом, в результате проведенных исследований получен набор композиционных сорбентов с оптимизированным составом и структурными характеристиками, изучены их спектральные характеристики, микроструктура поверхности, кислотные свойства, что позволяет

целенаправленно использовать сорбционные материалы для последующего получения на их основе специфичных иммуносорбентов.

### 3.2. Химическое модифицирование поверхности композиционных магносорбентов функциональными группами

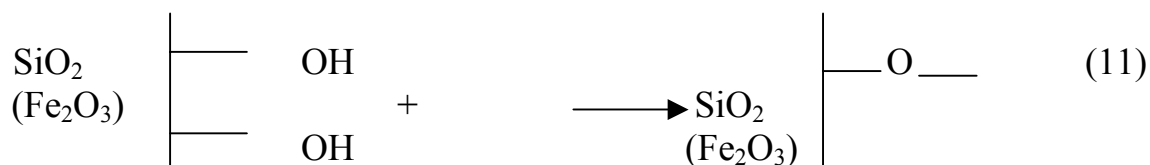
В предыдущем разделе данной главы представлены результаты исследований по синтезу композиционных сорбентов, содержащих в структуре полимер хитозан.

С целью дальнейшего активирования композиционных сорбентов функциональными группами нами разработаны три варианта модифицирования носителей - бензохиноновый, окислением и с применением глутарового альдегида:



Синтез альдегидосодержащего магносорбента проводили следующим образом: к 1 г хитозанкремнеземного сорбента приливали 20 мл дистиллированной воды, содержащей 0,5 г перхлората натрия. В течение 1 часа в темноте при температуре  $(22 \pm 4)^\circ\text{C}$  инкубировали сорбент. Затем его отмывали дистиллированной водой (6кратно, по 70-80 мл). Была определена концентрация альдегидных групп магносорбентов в соответствии с методикой, описанной в работе автора (В.А. Климова, 1971), концентрация альдегидных групп на поверхности сорбентов составила 0,42 мг-экв/г, результаты по достоверности и воспроизводимости аналитического метода представлены в таблице 9.

Разработан метод модифицирования бензохиноном хитозанкремнеземных сорбентов:



Получение магносорбента проводили следующим образом: к 1 г композиционного хитозанкремнеземного сорбента приливали 5мл 0,1 М фосфатного буфера с pH 8,5, содержащего 2,5 мг бензохинона. Инкубировали сорбент при температуре  $22 \pm 4^{\circ}\text{C}$  в течение 1 часа. Затем магносорбент промывали трижды по 60–80 мл фосфатным буфером с pH 8,5.

При данном химическом модифицировании образуются функциональные группы на поверхности сорбента, которые способны к ковалентному связыванию с остатками аминокислот – тирозина, лизина, гистидина, входящих в состав белкового лиганда (М. Тривен, 1983).

В экспериментальных исследованиях использован вариант модифицирования поверхности магносорбентов глутаровым альдегидом.

Получение магносорбента проводили следующим образом: к 1 хитозанкремнеземного сорбента добавляли 2 мл дистиллированной воды и 1,5 мл 25% глутарового альдегида. Инкубировали 15–17 часов при температуре  $22 \pm 4^{\circ}\text{C}$ . Затем сорбент отмывали шестикратно по 60 мл дистиллированной водой.

**Таблица 9. Воспроизводимость экспериментальных данных при определении альдегидных групп композиционных магносорбентов**

Образец магносорбента	C <sub>i</sub>	C <sub>i</sub> -C	C мг-экв/г	S <sup>2</sup>	S	$\frac{E_{0,95}}{C} 100\%$	C мг-экв/г
Альдегидо-композиционный сорбент	0,42	0					
	0,42	0	0,42	$1,0 \times 10^{-4}$	$1,0 \times 10^{-2}$	$2,5 \times 10^{-2}$	0,42±0,03
	0,41	+0,01					
	1,25						

В таблице 10 представлены характеристики разработанных сорбентов.

**Таблица 10. Характеристики композиционных сорбентов**

**для иммобилизации лигандов**

Наименование синтеза	Функциональные группы	Применение
Формирование пористой структуры кремнезема в присутствии хитозана		Иммобилизация антител и антигенов
Бензохиноновый метод		Ковалентная иммобилизация
Метод окисления		
Деструкционно-эпитаксиальное осаждение		Координационно-ионная иммобилизация лигандов
Где Э–Cu, Ca, Mg, Fe		

Таким образом, в результате проведенных исследований разработан набор композиционных сорбентов, имеющих следующие преимущества:

- стандартность структурных характеристик сорбентов таких как удельная поверхность, объем и размер пор, что обеспечивает высокую адсорбционную емкость;
- химическая инертность;
- механическая прочность;
- атоксичность;
- легкость стерилизации;
- стабильность свойств при хранении;
- наличие с количественным содержанием магнитной составляющей обеспечивает упрощение манипуляции с магносорбентами.

### **3.3. Получение магноиммуносорбентов иммобилизацией специфических иммуноглобулинов на поверхности магносорбентов**

Одним из важнейших условий получения магноиммуносорбентов с высоким уровнем емкости, специфичности и чувствительности является выбор эффективных методов иммобилизации лигандов.

Иммобилизацию иммуноглобулинов на поверхности магносорбентов проводили следующим образом: к 0,2 мл 10% взвеси магносорбента приливали 1 мл иммуноглобулинов чумных, варьируя количество белка от 0,5 до 10 мг/мл, ковалентное связывание проводили в течение 1–24 часов, при температуре 5<sup>0</sup>С; 22+4<sup>0</sup>С и 38<sup>0</sup>С.

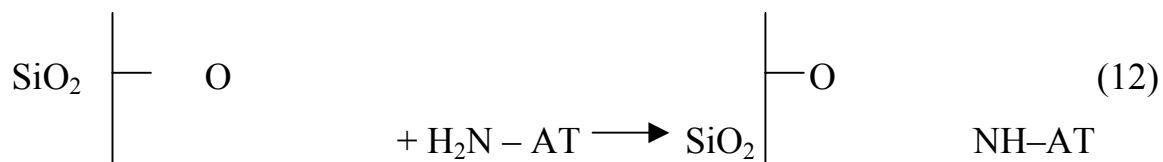
Проведены исследования кинетических параметров процесса иммобилизации с поверхностью сорбентов специфических иммуноглобулинов. Результаты, представленные на рисунке 7, свидетельствуют о том, что равновесный процесс наблюдается после 1 часа иммобилизации. В ходе исследования кинетики иммобилизации

иммуноглобулинов чумных установлены значения констант согласно методики, предложенной автором (И.В. Березин, 1976).

**Рисунок 7. Количество иммобилизованного белка в зависимости от времени и температуры**

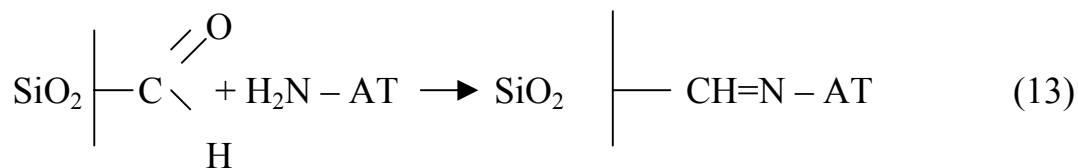
Установленные значения констант иммобилизации чумных иммуноглобулинов на магносорбенте, активированном методом окисления и содержащим альдегидные группы, имеют близкие значения, которые составляют соответственно  $0,93 \times 10^{-2} \text{ мин}^{-1}$  и  $0,96 \times 10^{-2} \text{ мин}^{-1}$ .

Для сравнительного аспекта нами использованы три разных метода получения иммуносорбентов иммобилизацией чумных иммуноглобулинов. Ниже представлена схема получения иммуносорбентов бензохиноновым методом:



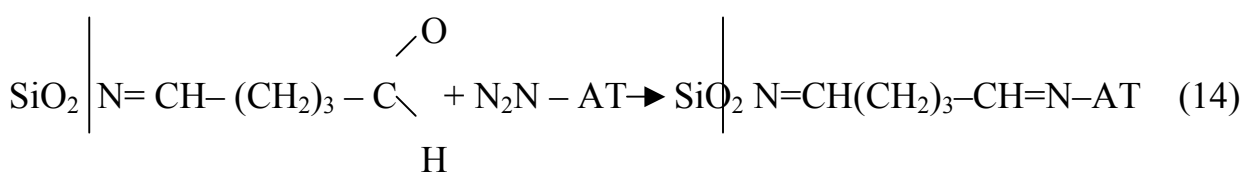
В процессе иммобилизации олигогидрохиноновые группы на поверхности сорбента взаимодействуют с аминокруппами белка.

Далее представлена схема иммобилизации антител через альдегидные группы, которые были получены перхлоратным окислением хитозаномагносорбентов:



При ковалентном связывании антител с активированным магносорбентом иммобилизация осуществлена с образованием азометиновых связей.

По третьему варианту схема получения композиционных магноиммуносорбентов с применением глутарового альдегида имеет следующий вид:



Для оптимизации условий получения магноиммуносорбентов проведены исследования влияния таких факторов, как температура, значение рН раствора иммуноглобулинов на свойства магноиммуносорбентов – специфическая активность и чувствительность.

Для изучения влияния рН раствора иммуноглобулинов на процесс их иммобилизации, в первом случае доводили значение рН до 9,0 с помощью 0,5% раствора едкого натрия, а во втором случае – до значения рН, равное 5,5, при помощи 2 М раствора соляной кислоты. Иммобилизацию иммуноглобулинов с разными магноиммуносорбентами осуществляли в течение 1 часа при температуре 22±4°C. Далее иммуносорбенты использовали в тест-системах для иммуноферментного анализа. Результаты представлены в таблице 11.



**Таблица 11. Чувствительность композиционных чумных магноиммуносорбентов**

Значение pH иммуноглобулинов	Метод синтеза КМИС	Чувствительность м.к/мл
9,0	БХА	$10^2$
	ГХА	$10^3$
	АХА	$10^2$
7,0	БХА	$10^2$
	ГХА	$10^4$
	АХА	$10^2$
5,5	БХА	$10^2$
	ГХА	$10^3$
	АХА	$10^2$
7,0	FeКС	$10^3$

БХА – бензохинонхитозаноаэросилогель

ГХА – глутаральхитозаноаэросилогель

АХА – альдегидохитозаноаэросилогель

FeКС – железокремнеземный элементсодержащий сорбент

Исследуемые диагностические тест-системы специфичны, поскольку при учете результатов ИФА показания оптической плотности опытных образцов (с гомологичными микроорганизмами) в 1,5 раза превышали показания контрольных (с гетерологичными микроорганизмами).

Проведены экспериментальные исследования по иммобилизации чумных иммуноглобулинов на композиционных магносорбентах при температуре  $5^{\circ}\text{C}$ ,  $22+4^{\circ}\text{C}$ ,  $37^{\circ}\text{C}$  и  $55^{\circ}\text{C}$ . Результаты исследований, представленные в таблице 12, свидетельствуют, что максимальная адсорбционная емкость композиционных магносорбентом наблюдается при температуре  $5^{\circ}\text{C}$  и  $22^{\circ}$ . Повышение температуры до  $55^{\circ}$  в процессе

иммобилизации иммуноглобулинов приводит к снижению уровня специфической активности и чувствительности композиционных сорбентов, применяемых в ИФА.

Таким образом, в соответствии с экспериментальными данными, оптимальными факторами, которые обеспечивают получение иммуносорбентов, обладающих высоким уровнем специфической активности и чувствительности, являются следующие: время иммобилизации специфических иммуноглобулинов 1,5 часа при значении pH раствора белка 6–8 и температуры от 5 до 22<sup>0</sup>С.

**Таблица 12. Зависимость количества иммобилизованного белка, чувствительности хитозанкремнеземных композиционных магноиммуносорбентов от температуры при иммобилизации лиганда**

Наименование иммуноглобулинов	Температура иммобил. белка, <sup>0</sup> С	Количество иммобилизованного белка, %	Время иммобилизации, ч	Чувствительность м.к/мл
Чумные	5	68	1,5	10 <sup>2</sup>
	22	65	1,5	10 <sup>2</sup>
	37	65	1,5	10 <sup>2</sup>
	55	26	1,5	10 <sup>3</sup>

На основе хитозанкремнеземных сорбентов, активированных бензохиноном и окислением с помощью перхлората натрия, разработаны эффективные композиционные магноиммуносорбенты, имеющие преимущества по уровню чувствительности и специфичности, технологичности получения перед глутаральдегидным методом получения активированных сорбционных материалов. В данном случае проявились недостатки этого метода, связанные с тем, что глутарового альдегида практически не существует в мономерном виде (P. Monson, 1978), и это приводит к неконтролируемости процесса активирования поверхности

сорбента, а также к нестандартности в синтезе активированного магносорбента по количеству альдегидных групп. Магноиммуносорбенты, получаемые бензохиноновым методом и окислением, при хранении (4<sup>0</sup>С) сохраняли стабильность свойств в течение одного года (срок наблюдения).

Вышеизложенные научные разработки легли в основу заявки на изобретение № 2003136322/15 «Способ получения иммуносорбента», на которую получено положительное решение формальной экспертизы ФИПС от 13.01.04г.

## **ГЛАВА 4. Использование магнитоуправляемых иммобилизованных систем для глубинного культивирования вакцинного штамма чумного микроба**

### **4.1. Глубинное культивирование чумного микроба, иммобилизованного на магнитные носители**

Исследования особенностей глубинного аппаратного культивирования иммобилизованных в магнитные носители бактериальных клеток весьма актуальны, поскольку позволяют использовать преимущества иммобилизации и магнитного манипулирования продуцентом биотехнологического процесса.

Однако применение магниточувствительных биологических систем для управления культивирования микроорганизмов недостаточно изучено. Одной из попыток использования магносорбента с иммобилизованными микробными клетками для глубинного культивирования были исследования И.В. Владимцевой (2002) на модели вакцинного штамма *Y. pestis EV*. Метод глубинного аппаратного культивирования для данного микроорганизма достаточно хорошо изучен и имеет важное практическое значение, т.к. *Y. pestis EV* применяется в качестве продуцента при производстве живой чумной вакцины с 1943г. В своих экспериментах автор (И.В. Владимцева, 2002) использовала 15 микрогранулированных носителей различной химической природы, иммобилизуя живые микробные клетки внутрь микрогранул во время их синтеза. Из всех исследованных носителей наиболее пригодными оказались альгинатные, в связи с тем, что у остальных отмечались недостатки: низкая механическая прочность, возможность микробной утилизации, токсическое действие компонентов синтеза на живые микроорганизмы, трудоемкость и сложность при изготовлении.

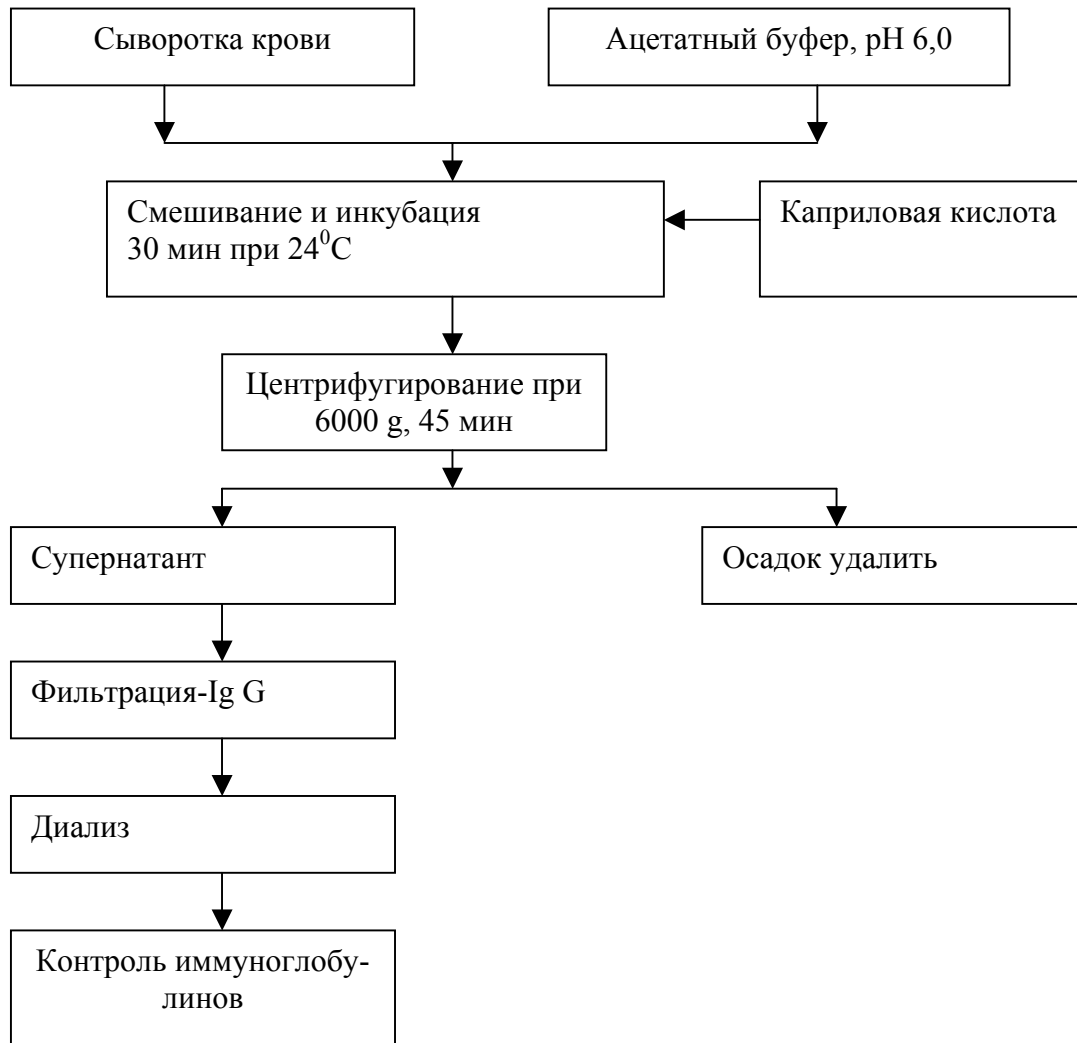
Целью настоящих исследований явилось изучение возможности и эффективности использования композиционного магноиммуносорбента для глубинного культивирования вакцинного штамма *Y. pestis EV*. Выбор композиционного сорбента для этих целей не случаен и базируется на ряде его положительных свойств: использование нетоксичных отечественных компо-

нентов технологии, простота изготовления, механическая и химическая прочности, высокая сорбционная емкость, химическая инертность. Кроме этого, органокремнеземный сорбент обладает свойством прочно ковалентно связываться со специфическими иммуноглобулинами, которые, в свою очередь, вступая в реакцию с антигеном (микробной клеткой), образуют прочное соединение из антигена и антитела, называемое иммунным комплексом. Еще одним преимуществом такого сорбента является то, что все иммобилизованные микробные клетки находятся на поверхности иммуносорбента, имея свободный доступ к питательной среде, и интенсивно размножаются. В то время, как микробные клетки, иммобилизованные в другие виды сорбентов механическим включением внутрь микрогранул и находящиеся у их поверхности, имеют ограниченный доступ к питательной среде. Клетки же, находящиеся внутри сорбента, лишены возможности контакта с питательной средой и, следовательно, не участвуют в накоплении микробной биомассы (рисунок 8).

Компонентами синтеза магноиммуносорбента явились микрогранулированный хитозанкремнеземный магносорбент (глава 3) и иммуноглобулины G, выделенные из гипериммунной чумной кроличьей сыворотки крови. Для получения гипериммунной сыворотки использовали водно-солевой экстракт, извлеченный из биомассы *Y. pestis* EV, выращенной на агаре Хоттингера при  $(27 \pm 1)^\circ\text{C}$  в течение 48 часов. Этот выбор обоснован тем, что данные ряда исследователей показывают, что такие экстракты обладают наиболее сложным макромолекулярным составом, и в них обнаруживаются в тех или иных количествах все выявленные у чумного микроба антигены (Н.А. Бельская, В.С. Митина, В.И. Вейнблат, 1970; Н.А. Бельская, В.С. Митина, В.И. Вейнблат, 1972; В.И. Вейнблат, В.В. Каминский, Л.С. Орлова, 1972; В.И. Вейнблат, 1974; В.И. Вейнблат, М.С. Веренков, С.М. Дальвадян, 1983; М.М. Титенко, В.И. Вейнблат, 1985; E.E. Baker, H. Sommer, L.E Foster, 1952).

Способ гипериммунизации заключался в следующем: кроликам-продуцентам вводили по 0,6мл 3% водно-спиртового раствора феракрила в подушечки задних лап. На 5-7 день водорастворимый антиген возбудителя чумы (0,2 мг) смешивали с 1,2мл 1% водно-спиртового раствора феракрила и по 0,6мл вводили в подколенные лимфатические узлы. Через три дня такую же смесь вводили внутримышечно трехкратно с промежутками в 4 дня. На 30 день от животных получали по 4мл иммунной сыворотки, добавляли половинные дозы антигена в каждую сыворотку. Полученный комплекс антиген-антитело (Аг-Ат) вводили четырехкратно по 1мл с промежутками в 3-4 дня внутривенно тому же животному, от которого получена иммунная сыворотка. Специфическая активность полученных сывороток в РНИФ достигала  $1:393,84 \pm 64,32$  –  $1:1772 \pm 252,28$ , а в РИД - не ниже  $1:28,8 \pm 2,5$ . Проверка специфичности полученных сывороток на гетерологичных штаммах различных микроорганизмов показала, что перекрестные реакции в РНИФ отсутствуют со всеми взятыми штаммами (*Y. enterocolitica*, *Y. pseudotuberculosis*, *E. coli*).

Из гипериммунной сыворотки выделяли фракцию IgG преципитацией каприловой кислоты (В.И. Вейнблат, 1974). При таком способе в преципитате содержится до 70% иммуноглобулинов класса G. Метод выделения иммуноглобулинов заключался в следующем (рисунок 8): к 40 мл сыворотки добавляли 64мл 0,06М раствора ацетатного буфера и 0,28мл каприловой кислоты, интенсивно перемешивали на магнитной мешалке, инкубируя 30 минут. Центрифугировали при 6000g в течение 40 минут, фильтровали, осадок удаляли, а супернатант представлял собой IgG. Доводили pH до 7,2 и помещали на диализ против 0,1М раствора фосфатно-солевого буфера. Концентрация белка после диализа составляла 5-7мг/мл, поэтому проводили концентрирование, помещая диализные мешки с иммуноглобулинами в ПЭГ-6000. Магносорбент получали по методу, изложенному в разделе 3.3.



**Рисунок 8. Схема получения иммуноглобулинов с помощью каприловой кислоты**

Все манипуляции по приготовлению КМИС осуществляли в стерильных условиях. Иммуноглобулины G стерилизовали методом ультрафильтрации на установке «Millipore» (США) или «Владистарт» (Россия).

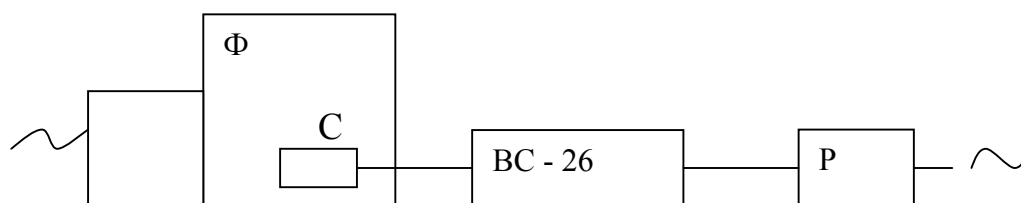
Для получения иммобилизованных на магнитном носителе бактериальных клеток использовали производственную культуру вакцинного штамма *Y. pestis* EV, находящуюся в R-форме (колонии шероховатые с зернистым центром коричневого цвета и кружевной зоной по периферии), обладающую морфологическими, культуральными и биохимическими свойствами глицеринегативной разновидности чумного микроба, стойко удерживающую свой биохимический тип. Культуру *Y. pestis* EV засеивали в бульон Хоттин-

гера рН ( $7,1 \pm 1$ ) и инкубировали при температуре ( $27 \pm 1$  °С) в течение 48 часов. После просмотра мазков, окрашенных по Граму, на отсутствие посторонней микрофлоры во флаконы с выросшей культурой вносили магноиммуносорбент, при этом концентрация микроорганизмов была не ниже  $1 \times 10^9$  м.кл./мл среды. В течение  $40 \pm 5$  минут контакта микробных клеток с магнитным носителем происходила прочная иммобилизация чумного микроба на поверхности магнитоуправляемого хитозанкремнеземного иммуносорбента на основе реакции «антиген-антитело». После чего магноиммуносорбент с фиксированными микробными клетками вносили в лабораторный ферментер (ЛКВ, Швеция), представленный на рисунке 9, и использовали в качестве инокулята при глубинном аппаратном культивировании вакцинного штамма возбудителя чумы.

**Рисунок 9. Лабораторный ферментер (ЛКВ, Швеция)**



Для создания постоянного электромагнитного поля, необходимого для удерживания магноиммуносорбента с иммобилизованными микробными клетками, использовали соленоид, представляющий 15 витков катушки (рисунок 10). Соленоид помещали в сосуд ферментера, полностью погружая его в среду культивирования, которой служил питательный бульон. Питание соленоида осуществляли постоянным током при напряжении 4-5В от выпрямителя ВС-26, соединенного реостатом. Параметры напряженности электромагнитного поля в центре ферментера во время культивирования были 60 Эрстед, возле обмотки катушки – около 230 Эрстед, при этом взаимодействие электромагнитного поля на бактериальные клетки нивелировалось, благодаря перемешиванию культуральной среды.



Обозначения: Ф – ферментер  
С – соленоид  
ВС-26 – выпрямитель  
Р – реостат

**Рисунок 10. Блок-схема системы для глубинного культивирования чумного микроба**

Глубинное культивирование *Y.pestis EV* проводили согласно регламента производства (РП) № 702-97. Для выращивания микробной взвеси в ферментере в качестве питательной среды использовали бульон Хоттингера рН (7,1±0,1), инкубирование проводили при температуре (27±1<sup>0</sup>С). Через 3-6 часов после начала культивирования в питательную среду добавляли стериль-

ный 40% раствор глюкозы, используемый для подкормки капельным методом. Критерием интенсивности введения глюкозы служил показатель реакции среды (рН), который должен находиться в пределе 6,8-7,6. За цикл выращивания вводили  $(15 \pm 3)$ г глюкозы в сухой массе на 1литр бульона. Выращивание прекращали в начале стационарной фазы роста микробной популяции, на что косвенно указывали следующие показатели: максимальное неизменяющееся количество бактерий в течение 2-3 часов роста; уменьшение скорости потребления глюкозы при неизменяющейся или даже возрастающей концентрации микробов. Контролем служило глубинное культивирование *Y.pestis EV* по методике периодического выращивания в ферментере без применения иммобилизованного сорбента. Для определения фазы роста в процессе культивирования каждые три часа отбирали стерильно пробы и 0,1мл взвеси высевали на пластинке агара Хоттингера рН  $(7,2 \pm 0,1)$ . После трех суток инкубации подсчитывали количество выросших колоний по формуле:

$$n = 3,31q \frac{B}{b}, \quad \text{где}$$

$b$  – количество бактерий в начале;  $B$  – количество бактерий в конце определенного промежутка времени, а также период генерации –  $q$ :

$$q = \frac{t}{n}, \quad \text{где } t \text{ – время роста культуры; } n \text{ – число поколений.}$$

Анализируя динамику накопления биомассы производственного штамма *Y.pestis EV* в процессе глубинного культивирования с использованием магнитоуправляемых иммобилизованных систем, можно отметить, что при первом выращивании lag-фаза в среднем длилась 8-9 часов, после чего наступала экспоненциальная фаза, во время которой отмечались интенсивный рост и размножение клеток. Через 18-20 часов наступала стационарная фаза роста, в начале которой производили слив культуральной жидкости, оставляя

соленоид в рабочем состоянии. В сосуд заливали свежую порцию бульона Хоттингера и проводили повторное выращивание биомассы, не внося дополнительное количество инокулята. Так повторяли пять раз.

Анализ динамики роста при повторных выращиваниях иммобилизованных клеток вакцинного штамма чумного микроба показал, что lag-фаза практически отсутствовала, а стационарная фаза роста наступала через  $(15 \pm 1)$  часа. При этом «урожай» биомассы при первом и повторных глубинных культивированиях был фактически одинаковым и составлял в среднем  $7 \times 10^{10}$  м.к./мл среды. По сравнению с контролем (без иммобилизованного инокулята) количество биомассы увеличивалось на  $40 \pm 5\%$  (рисунок 11). Описанные эксперименты были проведены на пяти сериях ферментативного бульона Хоттингера.

**Рисунок 11. Кривые роста популяции *Y.pestis EV* при глубинном культивировании**

1. Выращивание без МИС – инокулята (контроль)
2. Первичное выращивание с МИС-инокулятом
3. Повторное выращивание с МИС-инокулятом

Методические приемы аппаратного культивирования *Y.pestis EV* с применением МИС-инокулята изложены в методических рекомендациях «Глубинное культивирование вакцинного штамма чумного микроба с ис-

пользованием магнитоуправляемых иммобилизованных систем», одобренных Ученым Советом института (протокол № \_\_\_\_ от \_\_\_\_ 2004г.) и утвержденных директором СтавНИПЧИ.

Выращенную вакцину подвергали лиофилизации на установке для сублимационной сушки ТГ-5. Вакцинную взвесь разливали в ампулы ШПВ-6 по 2 мл и помещали в низкотемпературный холодильник НС 700/50 «Frigeria», (ЧССР), имеющей температуру в рабочей камере минус 40<sup>0</sup>С, выдерживали при этой температуре не менее 5 часов.

Доведя температуру в камере высушивания до минус 70<sup>0</sup>С, начинали лиофилизацию по достижению в сушильной камере аппарата остаточного давления 13,3Па. В процессе лиофилизации осуществляли почасовой контроль и регистрацию основных параметров (вакуум, температура конденсатора, полоч, высушиваемого материала, охлаждающей жидкости). Через 8-12 часов, когда температура препарата достигала 5<sup>0</sup>С, включали подогрев и досушивали препарат до температуры (28±1)<sup>0</sup>С, выдерживая при этой температуре 3-4 часа (рисунок 12).

**Рисунок 12. График режима сублимационного высушивания чумной вакцины**  
Температура материала  
Температура подогрева  
Температура конденсатора  
Вакуум в системе

Время лиофилизации 24-36 часов. Ампулы с вакциной запаивали на газокислородной горелке и хранили при температуре 4-6<sup>0</sup>С.

#### **4.2. Изучение свойств вакцины чумной живой сухой, выращенной с помощью иммобилизованного инокулята**

Изучение свойств вакцинного штамма *Y.pestis* EV, выращенного в условиях глубинного аппаратного культивирования при использовании иммобилизованного на магнитном сорбенте инокулята, проводили в соответствии с фармакопейной статьей 42-3877-99. Для этого из каждой серии отбирали по три ампулы вакцины.

При посеве на чашку Петри с агаром или в бульон Хоттингера рН (7,1±0,1) при (27±1)<sup>0</sup>С через 48 часов отмечался типичный рост штамма чумного микроба в R-форме на агаре, в бульоне - агглютинативный с образованием на дне рыхлого осадка, без помутнения бульона. В мазках, окрашенных по Граму и Гинсу (для выявления капсулы): из агаровой культуры - короткие грамтрицательные полиморфные палочки овальной формы; из бульонной – биполярноокрашенные, располагающиеся цепочками палочки; инкубированные при температуре (37±1)<sup>0</sup>С образуют капсулу (рисунок 13).

**Рисунок 13. Чумной микроб: А – окраска по Граму; Б – окраска по Гинсу  
(1 – чумной микроб; 2 – капсула чумного микроба)**

Штамм не ферментировал сахарозу, лактозу, рамнозу, глицерин в течение шести суток, лизировался бактериофагами диагностическими чумными Л-413 С и Покровской: на газоне культуры в чашке Петри, засеянном фагом бактериологической петлей ( $1 \times 10^5$ - $1 \times 10^6$  корпускул в 1мл) – четкое стерильное пятно.

При определении выживаемости микробов использовали культуральный метод согласно ТУ 42.14.214 – 81.

Ампулу с вакциной вскрывали, сухую культуру растворяли забуференным физиологическим (ЗФР) раствором до первоначального объема. Полученную взвесь десятикратно титровали по 0,5мл в 4,5мл ЗФР. Из разведений  $10^{-7}$  и  $10^{-8}$  засевали по 0,1мл на три чашки Петри с дрожжевым агаром. После инкубации в течение 2-4 суток при  $27 \pm 1^\circ\text{C}$  подсчитывали колонии. Для каждого образца вычисляли процент живых микробов к числу засеянных, которых рассчитывали, исходя из показателя оптической концентрации. Последнюю определяли по ОСО мутности (ОСО 42-28-59-85-П), 10 единиц которого эквивалентно  $1 \times 10^9$  м.к. чумного микроба.

После определения процента живых микробов в трех образцах рассчитывали среднюю арифметическую, которую принимали за показатели жизнеспособности в данной серии вакцины.

Результаты изучения жизнеспособности (опытных и контрольных образцов) свидетельствуют, что при глубинном культивировании в электромагнитном поле с использованием иммобилизованного инокулята на магнитном носителе процент живых микробных клеток достигает не менее  $(55,4 \pm 5,8)\%$ , в то время, как в контрольных образцах этот показатель – не более  $(30 \pm 5)\%$ .

Показатель термостабильности (срок, в течение которого в препарате сохраняется 50% живых микробных клеток по отношению к первоначальному числу) при температуре хранения вакцины  $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$  был в пределах 8-9 суток, что соответствует ФС, согласно которой термостабильность вакцины должна быть не менее 7 суток. Определение проводили в течение 14 суток хранения.

Показатель термостабильности рассчитывали по формуле:

$$t = \frac{0.3 \times 14}{\lg A_0 - \lg A_n}, \quad \text{где: } t - \text{показатель термостабильности в сутках;}$$

$\lg A_0$  – логарифм первоначального числа микробных клеток в 1мл;  $\lg A_n$  – логарифм числа живых микробных клеток в 1мл через 14 суток хранения вакцины при температуре  $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ ; 0,3 – постоянная величина; 14 – срок хранения вакцины при температуре  $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$  в сутках.

Потерю в массе при высушивании определяли по ФС 42-3877-99. Для этого 0,15-0,2 г препарата помещали в бокс и сушили в вакуум-сушильном шкафу при температуре  $60^\circ\text{C}$  в течение трех часов. Расчет показателя в процентах производили по разности веса навески до и после высушивания по формуле:

$$A = \frac{(B - C) \times 100}{B}, \quad \text{где: } A - \text{потеря в массе; } B - \text{вес навески до сушки; } C - \text{вес навески после сушки.}$$

Данные по изучению свойств чумной вакцины, выращенной методом глубинного культивирования, представлены в таблице 13.

**Таблица 13. Характеристика чумной вакцины EV, выращенной при глубинном культивировании**

Серия	Количество живых микробных клеток, %	Потеря в массе при высушивании, %	Термостабильность, сутки
1–первичное выращивание с МИС-инокулятом	$54,0 \pm 4,4$	2,3	10,0
3-повторное выращивание с МИС-инокулятом	$57,3 \pm 3,9$	2,1	10,5
Контрольное выращивание без МИС-инокулята	$28,9 \pm 2,6$	1,9	9,4

Иммуногенность вакцины проверяли на белых нелинейных мышах массой  $(19 \pm 1)$  г и оценивали по величине  $ED_{50}$ . Для иммунизации использо-

вали культуру вакцинного штамма EV, полученную при первичном и повторном глубинном культивировании. Микробную взвесь, равную по концентрации 10 единицам ОСО мутности, готовили в 0,9% растворе хлорида натрия и вводили белым мышам в дозах  $8 \times 10^2$ ,  $4 \times 10^3$ ,  $2 \times 10^4$  и  $1 \times 10^5$  живых микробных клеток по 0,2 мл подкожно. На каждую дозу брали по 6 животных. Подкожное заражение для животных, привитых вакциной, составило 200 ДСЛ (Dosis certa Letalis= $LD_{100}$ ) вирулентного штамма Y. pestis 461, 1 ДСЛ которого не превышала 100 микробных клеток. Для контроля 5 неиммунизированных животных заражали 1 ДСЛ. Наблюдение за зараженными животными вели в течение 20 суток. Контрольные животные погибали от чумы в течение первых 10 суток после заражения. Павших животных вскрывали, органы и ткани подвергали бактериологическому исследованию, высевая их методом отпечатков на чашках с агаром Хоттингера рН ( $7,0 \pm 0,1$ ) с метилвиолетом в концентрации 0,05 г на 1 л и сернисто-кислым натрием в концентрации 0,2 г на 1 л. Иммуногенность по показателю  $ED_{50}$  вычисляли методом Кербера в модификации И.П. Ашмарина и А.А.Воробьева (1962), используя формулу:

$$\text{LgED}_{50} = \text{lg } D_n - \delta(\sum L_i - 0,5)$$

$D_n$ - максимальная иммунизирующая доза, взятая в опыт;

$\delta$ - логарифм кратности используемых разведений;

$\Sigma$ - сумма

$L_i$  – отношение числа выживших после заражения животных к числу взятых в опыт на данную дозу;

0,5 – постоянный коэффициент.

Результат проверки иммуногенности по показателю  $ED_{50}$  в опытах на белых мышах (от 9465 до 20188 живых микробных клеток) не превышали регламентные нормы: 40000 м.к. для белых мышей.

Таким образом, проведенные экспериментальные исследования по использованию композиционного хитозанкремнеземного иммуносорбента с



магнитными свойствами с иммобилизованными на нем микробами *Y.pestis* EV при глубинном аппаратном культивировании показали преимущества, связанные с возможностью многократного использования посевного материала, сокращением времени выращивания биомассы при повторном культивировании, повышением жизнеспособности микробных клеток вакцинного штамма чумного микроба. Придание иммуносорбенту магнитных свойств позволяет надежно удерживать его с инокулятом на соленоиде за счет ЭПП, при этом свойства чумной вакцины, выращенной таким способом, полностью соответствуют требованиям НД (фармакопейной статьи 3877-99), что свидетельствует о возможности и перспективности использования этого метода при производстве живой чумной вакцины.

#### **4.3 Получение капсульного антигена (Ф1) чумного микроба**

Большинство коммерческих и экспериментальных диагностических препаратов для различных вариантов экспрессных методов (флуоресцирующих антител, иммуноферментного и радиоиммунного анализов, хемилюминесценции, реакции непрямой гемагглютинации и др.) сконструированы на основе поли- и моноклональных антител к капсульному антигену чумного микроба (Ф1), а также на основе самой фракции (Т.М. Тараненко, С.М. Дальвадянц, Т.П. Боровикова, И.Ф. Ковалев, В.С. Дернова, 1972; В.И. Вейнблат, С.М. Дальвадянц, М.С. Веренков, 1983; М.М. Титенко, В.И. Вейнблат, М.С. Веренков, А.С. Васенин, 1983; В.И. Вейнблат, М.М. Титенко, М.С. Веренков, 1985; Г.П. Апарин, Е.П. Голубинский, 1989).

Общепринят препаративный метод получения капсульного антигена, разработанный E.E.Baker, H.S.Sommer, L.E.Foster et al (1951). Как известно, по этому методу чумные микробы выращивают на плотной питательной среде и высушивают ацетоном, экстрагируют водным раствором хлористого натрия. Очищенный препарат капсульного антигена получают в виде двух фракций (IA и IB) путем многократного переосаждения вещества сульфатом аммония. В исследованиях, представленных в работах (В.И. Вейнблат, С.М.

Дальвадянц, М.С. Веренков, 1983; В.И. Вейнблат, М.М. Титенко, М.С. Веренков, 1985), было показано, что метод Е. Бейкера не лишен определенных недостатков. Среди них наиболее существенными являются сравнительно небольшой конечный выход очищенных препаратов с единицы питательной среды, распад исходной молекулы капсульного антигена, отличающихся между собой физико-химическими свойствами и иммунобиологической активностью, загрязнение отдельных фрагментов капсульного антигена агаром питательной среды и т.д.

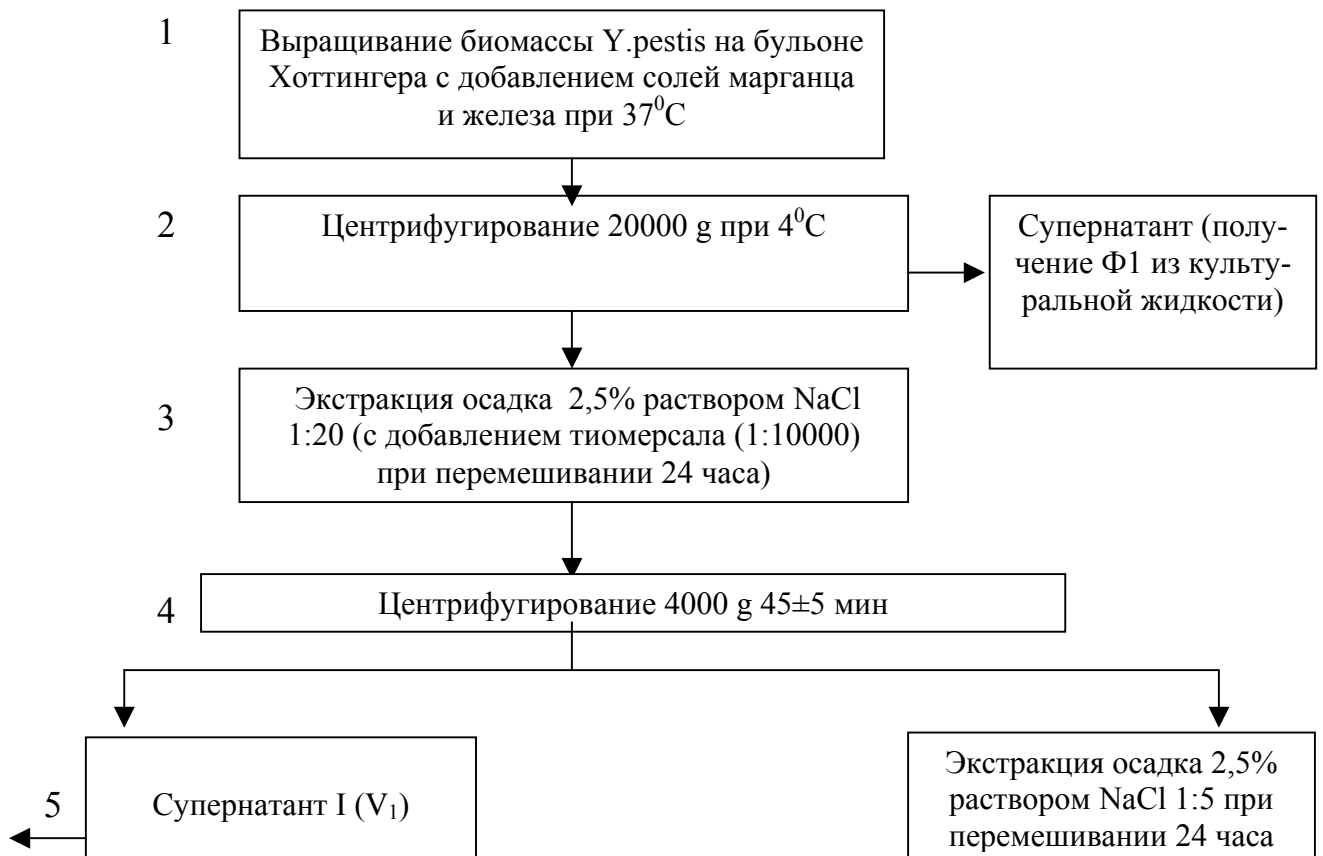
Чтобы нивелировать эти недостатки, мы проводили выращивание биомассы на жидкой питательной среде (бульон Хоттингера рН  $(7,1 \pm 0,1)$  с добавлением солей марганца и железа, стимулирующих рост клеток чумного микроба при  $37^{\circ}\text{C}$ ) с использованием иммобилизованного на МИС инокулята (чумных микробов штамма EV, выращенных при  $28^{\circ}\text{C}$ ). Выращивание проводили в ферментере. Среду в процессе роста бактерий аэрировали стерильным воздухом, периодически обогащали глюкозой, поддерживая рН в пределах  $(7,1 \pm 0,1)$  добавлением бикарбоната натрия. Культивирование чумных микробов начинали при  $28^{\circ}\text{C}$ , постепенно повышая температуру в течение 10–16 часов до  $37^{\circ}\text{C}$ , и затем продолжали выращивание при этой температуре еще в течение 24–26 часов. Выращивание *Y.pestis* EV в таких условиях повышает выход капсульного антигена в культуральную жидкость (В.И. Вейнблат, М.М. Титенко, М.С. Веренков, 1985).

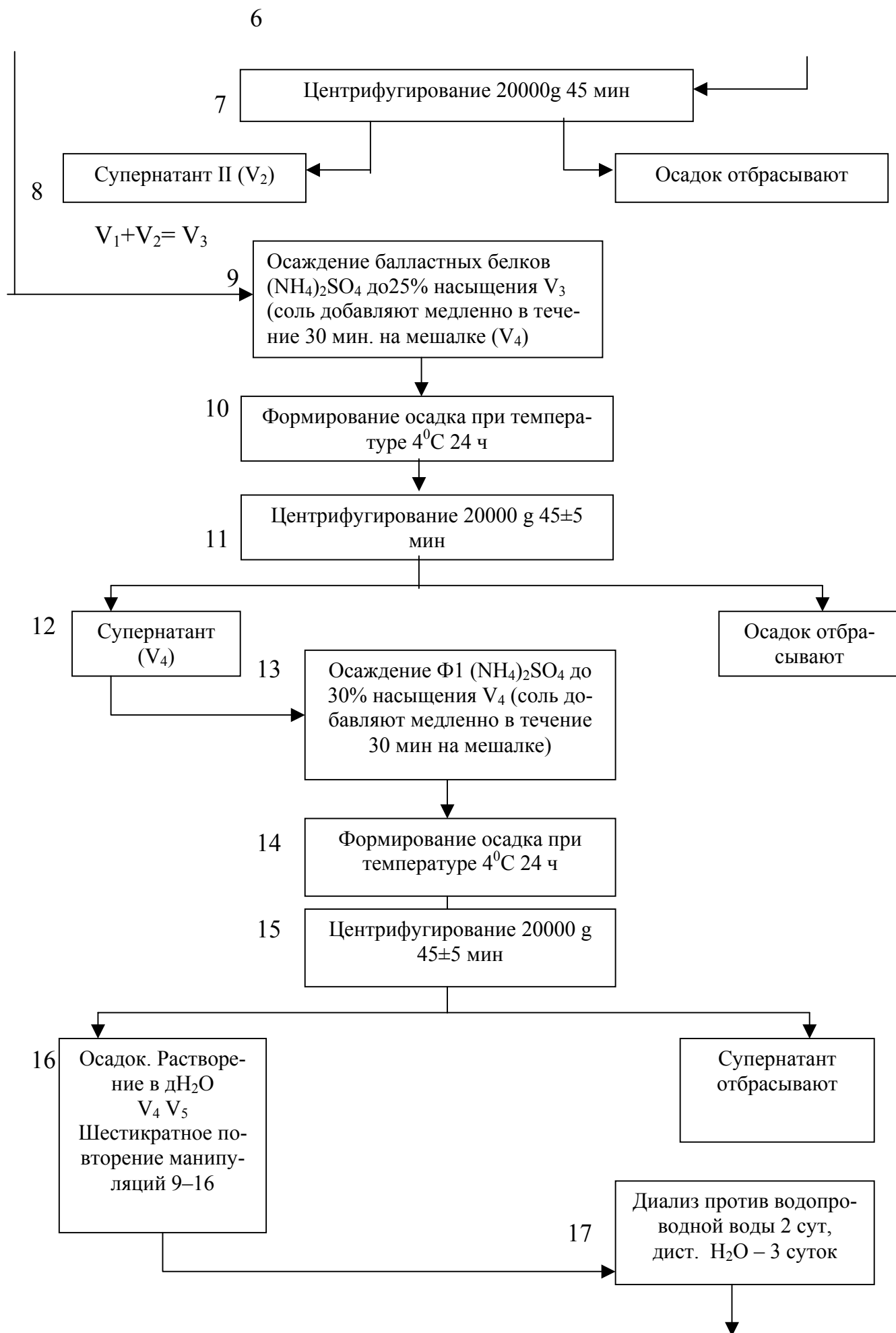
После завершения процесса выращивания культуральную жидкость и микробную массу разделяли центрифугированием. Оба продукта использовали для выделения капсульного антигена. Ведущей областью применения препарата, полученного по методу Бейкера, является изучение структуры и функций капсульного антигена, второстепенной – конструирование профилактических и диагностических препаратов (В.И. Вейнблат, С.М. Дальвадянц, М.С. Веренков, 1983). При выделении Ф1 из культуральной жидкости (методом изоэлектрической преципитации) получают более гетерогенный белок, однако он практически свободен от нуклеиновых кислот и полисахара-

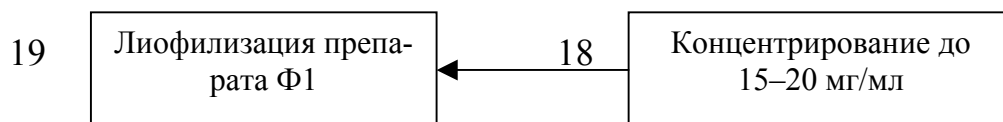
рида, а его выход намного превышает вышеуказанный метод, что связано с максимальным выделением антигена в осадок. Ведущая область применения такого препарата – конструирование химических вакцин и диагностикумов (Т.М. Тараненко, С.М. Дальвадянец, Т.П. Боровикова, И.Ф. Ковалев, В.С. Дернова, 1972; М.М. Титенко, В.И. Вейнблат, М.С. Веренков, А.С. Васенин, 1983).

Фракцию 1 чумного микроба выделяли из биомассы по методу Е.Е.Вакер et al. с той разницей, что мы отказались от получения ацетонового порошка. Осадок клеток после центрифугирования экстрагировали 2,5% раствором NaCl с добавлением тиомерсала (1:10000 для стерилизации). В дальнейшем проводили переосаждение капсульного вещества сульфатом аммония (рисунок 14). Выход препарата составлял  $8 \pm 2$  мг/л питательной среды.

Капсульный антиген из культуральной жидкости изолировали методом изоэлектрической преципитации (М.М. Титенко, В.И. Вейнблат, М.С. Веренков, А.С. Васенин, 1983).



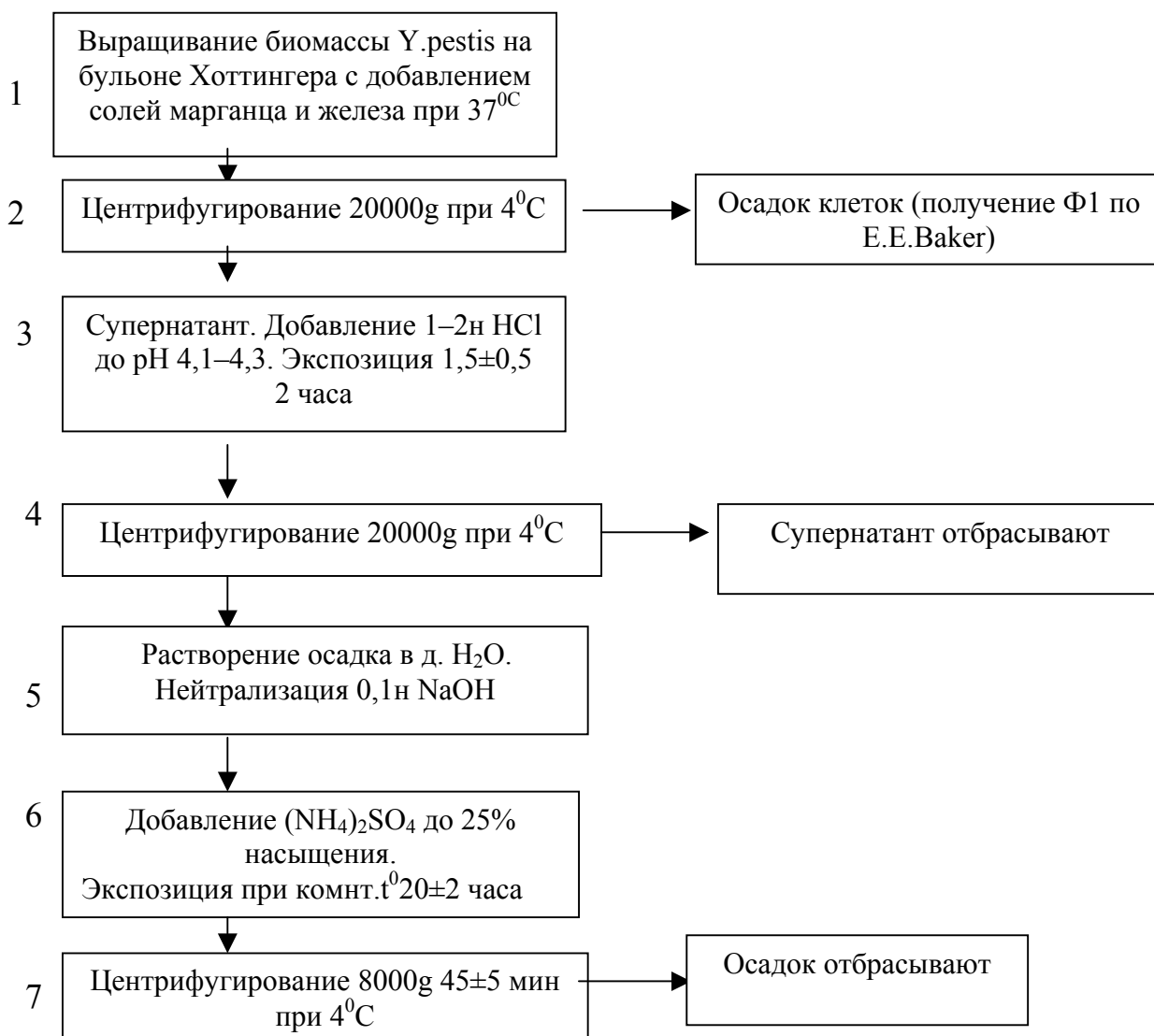


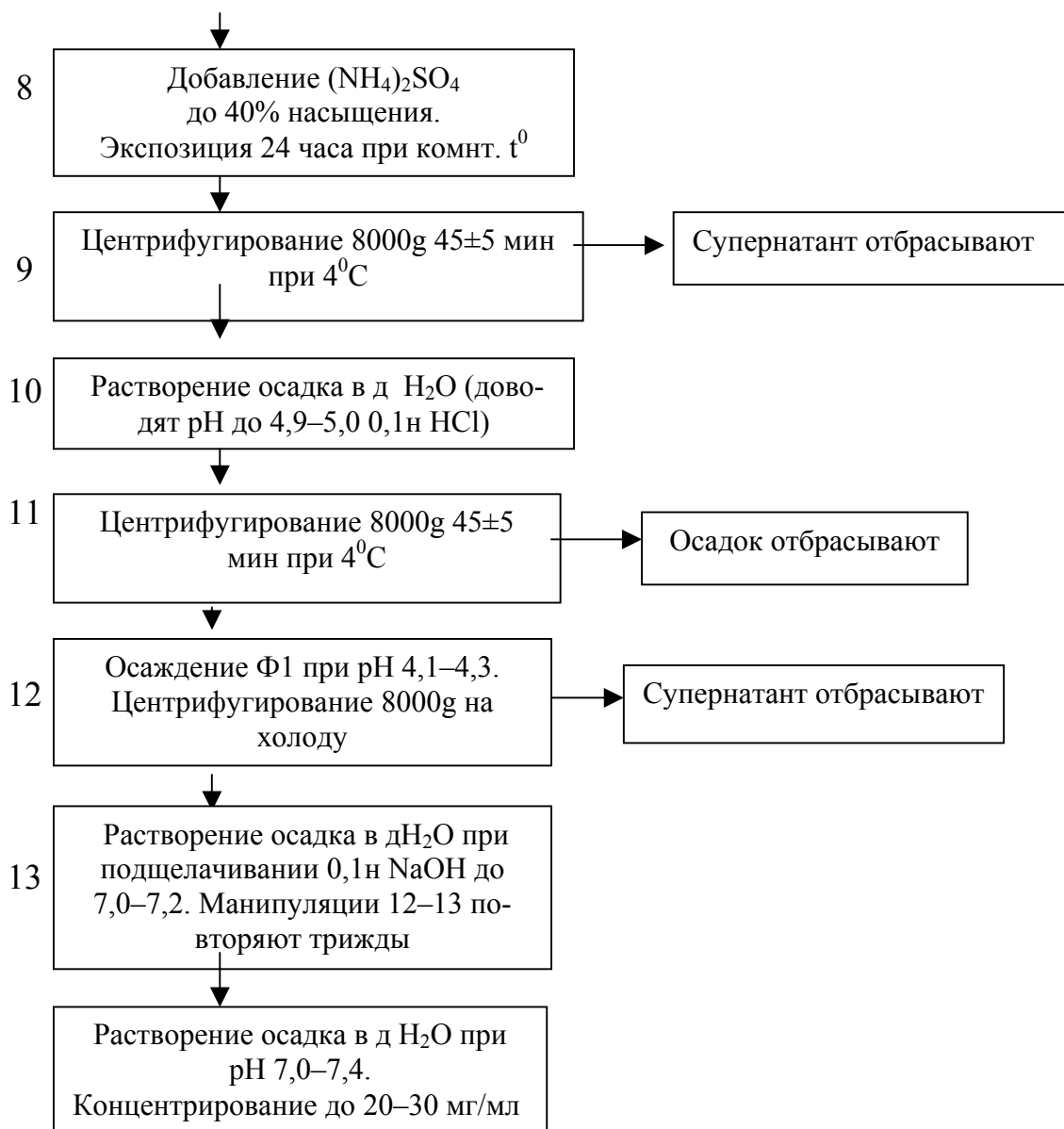


**Рисунок 14. Схема получения капсульного антигена *Y.pestis* из микробных клеток**

Преципитацию капсульного антигена проводили при рН 4,1–4,3. Выход препарата Ф1 составлял  $70 \pm 10$  мг/л питательной среды, что на порядок превышает таковой при получении капсульного антигена первым способом.

На рисунке 15 приведена схема получения капсульного антигена *Y.pestis* из культуральной жидкости изоэлектрической преципитацией.





**Рисунок 15. Схема получения капсульного антигена *Y.pestis* из культуральной жидкости изоэлектрической преципитацией**

Против фракции 1, изолированной из микробной биомассы *Y.pestis* EV и культуральной жидкости, были получены гипериммунные кроличьи сыворотки. По специфической активности и гомогенности, оцененные в реакции преципитации по Оухтерлони, они были практически идентичны (рисунок 16).

**Рисунок 16. Реакция иммунодиффузии в агаровом геле**

1 –  $\Phi 1_{(1)}$ , полученная из биомассы *Y.pestis* EV по E.E. Baker et al.

2 –  $\Phi 1_{(2)}$ , полученная из культуральной жидкости при выращивании *Y.pestis* EV

3 – антисыворотка против  $\Phi 1_{(1)}$

4 – антисыворотка против  $\Phi 1_{(2)}$

5-9 – разведение антисывороток от 1:2 до 1:32

Таким образом, при глубинном культивировании вакцинного штамма чумного микроба для получения капсульного антигена  $\Phi 1$  появляется возможность использовать как микробную биомассу, так и культуральную жидкость, что значительно увеличивает выход целевого продукта высокого качества.

## **ГЛАВА 5. Иммуноферментные тест–системы для диагностики чумы и индикации ее возбудителя**

В настоящее время метод иммуноферментного анализа завоевал прочные позиции в клинической диагностике, эпидемиологических исследованиях, биотехнологии, потеснив другие серологические методы, благодаря ряду существенных преимуществ. Так, обладая высокой чувствительностью и специфичностью, ИФА позволяет анализировать одновременно большое число проб, использовать полностью или частично автоматизированные системы или проводить анализ практически без оборудования; метод не требует очистки для обогащения проб, прост в выполнении. Известны два вида ИФА: гомогенный и твердофазный (гетерогенный). При гомогенном ИФА реакция взаимодействия антиген-антитело и ее детекция осуществляется в гомогенном растворе и учитывается по изменению активности фермента–маркера антигена. Отсутствие стадии разделения свободного и связанного с антителами антигена значительно сокращает время анализа, составляющего 2–20 минут. На основе гомогенного ИФА разработаны диагностические системы экспресс–анализа биологически активных соединений, нашедшие широкое применение в химической токсикологии, фармакологии и эндокринологии. В инфекционной диагностике гомогенный анализ до сих пор не получил применения.

Методы твердофазного ИФА основаны на использовании серологически активных компонентов, иммобилизованных на нерастворимых носителях, что обеспечивает их быстрое и эффективное разделение. Чувствительность и специфичность ИФА обусловлена не только степенью чистоты и активности используемых ингредиентов, но и свойствами твердой фазы, которая должна сохранять иммунологические свойства и стабильность в иммобилизованном состоянии, обладать минимальной активностью неспецифически связывать компоненты



анализируемой системы и быть удобной при разделении фаз. Наиболее широкое применение получили микроплаты с 96 лунками из оптически прозрачного полистирола, позволяющие производить весь цикл анализа от стадии иммобилизации до измерения активности фермента в каждой из лунок. С полистиролом могут быть связаны сорбционно как антитела, так и антигены различной природы. Однако наряду с достоинствами, твердофазная система имеет ряд проблем. Микроплаты, выпускаемые зарубежными и отечественными фирмами, обладают различными сорбционными свойствами, что существенно влияет на достоверность и воспроизводимость получаемых результатов (К.Л. Шаханина, А.А. Соколенко, И.П. Павлова и др., 1987; Л.Ф. Зыкин, А.Т. Яковлев, 1993). Количество антител (антигенов), используемое для образования иммунного комплекса, ограничено возможностями твердой фазы. Недостаточная концентрация антител (антигенов) ограничивает чувствительность ИФА. Качество адсорбции зависит от температуры, рН, ионной силы, времени инкубации. Процесс сорбции обратим и, следовательно, иммуносорбенты, полученные сорбционным путем, не подлежат длительному хранению (срок хранения 20 дней на холоде при герметизации) (О.А. Калинина, И.В.Емельянова, М.А. Лактионова, 1997).

В связи с этим, постоянно проводится поиск инертных носителей (отдельные ячейки, бусы, кюветы, нейлон, активированная бромцианом фильтровальная бумага, нитроцеллюлозные мембраны и т.п.), на поверхности которых протекают все процессы реакции ИФА.

В последние годы с целью повышения чувствительности и специфичности лабораторных методов, а также для создания новых диагностических препаратов стали применять иммуносорбционные методы на основе иммобилизованных антигенов и антител. Дополнительные удобства и значительные преимущества перед общепринятыми методами появились с началом использования сорбентов с магнитными свойствами, которые, в частности, нашли применение в качестве твердой фазы при

осуществлении прямого и непрямого вариантов иммуноферментного метода при выявлении микроорганизмов, их антигенов и специфических иммуноглобулинов (В.И. Покровский, 1986; А.М. Сухоруков, А.М. Пономарева, 1987; К.Л. Шаханина, А.А. Соколенко, И.П. Павлова и др., 1987; Л.И. Ванеева, И.Ю. Гридина, О.Н. Пантелеева и др., 1989; В.И. Ефременко, 1995; И.С. Тюменцева, 1996; М.Н. Касторная, 2003).

Синтезированный нами хитозанкремнеземный магносорбент, активированный перхлоратом натрия (глава 3), был использован в качестве матрицы при конструировании антительной и антигенной чумной диагностических тест–систем для иммуноферментного анализа (рисунок 17 ). При этом лигандами служили иммуноглобулины G, выделенные из гипериммунной чумной кроличьей сыворотки, и Ф1 чумного микроба, изолированная из культуральной жидкости изоэлектрической преципитацией (глава 4).

**Рисунок 17. Схема постановки ИФА и использованием МИС: А – для обнаружения антител; Б – для обнаружения антигена**

1 – антиген;

2 – специфическое антитело (АТ);

3- антивидовое АТ-фермент

4 – специфическое АТ-фермент

Для получения чумных иммуноферментных конъюгатов и магноиммуносорбента были использованы иммуноглобулины из антифракционной гипериммунной сыворотки, выделенные с помощью ПЭГ–6000.

В основу конъюгирования пероксидазы хрена с антителами положен метод предварительного окисления фермента до альдегидной формы периодатом натрия (Р.К. Nakane, А. Kawaoi, 1974). Навеску пероксидазы хрена (5мг) растворяли в 1 мл раствора натрия углекислого кислого в концентрации 0,1 М и добавляли 0,25 мл 0,32% раствора формалина. К растворимой пероксидазе добавляли 0,04М раствор периодата натрия из расчета 1 мл на 5 мг пероксидазы, инкубировали при легком помешивании в темноте 20 мин. Затем к 5 мг пероксидазы приливали 1,0 мл раствора этиленгликоля в концентрации 0,16М и после инкубации в темноте при легком помешивании в течение 1 часа раствор диализовали против карбонатного буфера в концентрации 0,01 М ( $9,65 \pm 0,05$ ) ед. рН в течение 18–20 часов при  $(4 \pm 2)^{\circ}\text{C}$  с двухкратной сменой буфера. К активной пероксидазе добавляли 1 мл раствора иммуноглобулинов в карбонатном буфере с концентрацией 0,01М ( $9,65 \pm 0,05$ ) ед. рН с содержанием белка 10 мг/мл и инкубировали 2 часа при слабом помешивании в темноте. Далее к смеси добавляли 5 мг натрия боргидрида, инкубировали 2 ч при температуре  $(4 \pm 2)^{\circ}\text{C}$  и диализовали против фосфатного буфера в концентрации 0,1М  $7,2–4,4$  ед. рН в течение 18–20 часов при температуре  $(4 \pm 2)^{\circ}\text{C}$ . Очистку конъюгата от несвязавшегося фермента осуществляли методом гель–фильтрации с использованием сефадекса G–100 на установке LKB–2137 (Швеция). В качестве элюата использовали 0,1М фосфатный буфер  $7,2–7,4$  ед рН. Фракции собирали в объеме 30 мл и исследовали светопоглощение каждой из них при длинах волн 280 нм и 430 нм. Фракции, имеющие RZ (соотношение экстинций при длинах волн 430–280нм), равное 0,4–0,6, объединяли.

В соответствии с вышеуказанной схемой конъюгации иммуноглобулинов и пероксидазы хрена, мы получили 5 серий

иммуноферментных конъюгатов. Рабочий титр и специфическую активность конъюгатов определяли по методике авторов M.Clark и A.Adams в «сэндвич»–варианте ИФА . При постановке ИФА использовали стандартные планшеты для иммунологических реакций. Для первого покрытия микроплат применяли иммуноглобулины из антифракционной чумной сыворотки. В лунки вносили по 100 мкл иммуноглобулинов, разведенных фосфатным буфером с рН 7,2–7,4 до концентрации белка 100 мкг/мл. Стабилизацию планшетов производили при температуре  $(37\pm 1)^{\circ}\text{C}$  в течение трех часов. Несорбированные иммуноглобулины удаляли, в лунки вносили по 100 мкл 1% бычьего сывороточного альбумина и выдерживали 1 ч при температуре  $(37\pm 1)^{\circ}\text{C}$ . Затем в первую лунку вносили антиген (Ф1) в концентрации 0,05 мг/мл и титровали в шахматном порядке на фосфатном буфере с рН 7,2–7,4, содержащем 0,05% Твин 20 и 0,1% бычьего сывороточного альбумина, 12–я лунка не содержала антигена и являлась контрольной. После часовой инкубации при температуре  $(37\pm 1)^{\circ}\text{C}$  несвязавшийся антиген удаляли, микропласты отмывали 4–5 раз 0,05% раствором твина–20 на фосфатном буфере и подсушивали. Далее в течение 1 часа при температуре  $(37\pm 1)^{\circ}\text{C}$  проводили инкубацию с антителами, мечеными пероксидазой хрена, от 1:100 до 1:800. Конъюгат вносили в лунку в объеме 100 мкл и инкубировали при  $(37\pm 1)^{\circ}\text{C}$  1 час. После 4–5 кратной промывки планшет производили определенные присутствия антигена. В качестве субстрат–индикаторной смеси применяли раствор, содержащий 10 мл цитратного буфера рН  $(5\pm 0,05)$ , 5мг ортофенилендиамина и 0,05% перекиси водорода.

Субстрат–индикаторную смесь добавляли по 100 мкл во все лунки и инкубировали при комнатной температуре без доступа света в течение 10 минут. Для остановки реакции использовали 2 М раствор серной кислоты, который вносили в лунки в объеме 50 мкл. Результаты реакции учитывали визуально или на вертикальном денситометре «Multiskan» и считали положительным, если оптическая плотность (ОП) исследуемого образца в 2 и более раза превосходила среднее значение ОП отрицательных контролей.

Рабочий титр иммунопероксидазных чумных конъюгатов составил 1:200–1:400. Все серии конъюгатов давали отрицательные результаты с водорастворимыми антигенами из гетерологичных штаммов *Y. enterocolitica*, *E. coli*, *Y. pseudotuberculosis*, что свидетельствовало о их специфичности.

При изготовлении магноиммуносорбента лигандом служили IgG, выделенные из антифракционных чумных иммунных сывороток, иммобилизацию которых на магносорбент осуществляли, как описано выше (глава 3).

Все манипуляции с магноиммуносорбентом в наших экспериментах производились с применением ряда технических устройств, разработанных сотрудниками Ставропольского и Волгоградского научно–исследовательских противочумных институтов. Данные технические средства обеспечивают фиксацию магносорбентов, их сепарацию, перенос, эффективное перемешивание в заданном режиме (В.И. Ефременко, 1996). Устройства размещены в компактной укладке, транспортируемой ручным способом и позволяющей осуществлять работу с ней как в лабораторных, так и в полевых условиях. В состав укладки входят магнитные ловушки различных конструкций для забора проб из объектов внешней среды, контейнеры для транспортировки магнитных сорбентов с фиксированными на их поверхности микроорганизмами, их антигенами, устройство для переноса магносорбентов с магнитной поверхности ловушки, устройство для отделения магносорбентов от жидкой фазы.

Для повышения эффективности исследований с применением магноиммуносорбента пробы пропускали через специальную проточную ловушку с фиксированным чумным КМИС, используя проточную систему (рисунок 18).

Исследуемая проба из верхней колбы самотеком проходила через магнитную ловушку. Скорость протекания, регулировалась зажимом.

**Рисунок 18. Исследование твердых проб с использованием проточной магнитной ловушки с КМИС**

Обозначения:

а- установка:

1– колба с суспензией пробы; 2–сетчатый фильтр на конце стеклянной трубки; 3–ватный фильтр; 4–зажим; 5–проточная магнитная ловушка с МИС; 6–соединительные трубки; 7–колба для приема пробы;

б–проточная магнитная ловушка:

1–фиксатор магнитной пробки; 2–пробка с постоянным магнитом; 3– проточный контейнер.

**Рисунок 19. Схема проведения иммуноферментного анализа во флаконах типа «пенициллиновых» с использованием КМИС**

Меняя местами колбы, можно многократно пропускать через ловушку исследуемую пробу, достигая максимального концентрирования инфекта на КМИС. После чего систему промывали 5–10 объемами (от исследуемой пробы) 0,9% раствором хлористого натрия, тем самым, обеспечивая отмывание магноиммуносорбента от контаминирующей микрофлоры и загрязнений.

Эксперименты проводили с обеззараженными клетками вакцинного штамма *Y.pestis* EV, а также с использованием вирулентных штаммов чумного микроба и в модельных опытах на садовой почве, контаминированной исследуемым возбудителем. Из культур *Y. pestis*, выращенных при температуре 37<sup>0</sup>С, готовили по 500 мл суспензии с содержанием 1x10<sup>1</sup>; 1x10<sup>2</sup>; 2x10<sup>2</sup>; 5x10<sup>2</sup>; 8x10<sup>3</sup> м.к. в этом объеме пробы, в которые вносили по 1 мл суспензии из гетерологичных штаммов (*Y.pseudotuberculosis* I–VI серотипов, *Y.enterocolitica*, *E.coli*) в концентрации 1x10<sup>9</sup> м.к./мл.

После пропускания проб через описанную систему, в результате которого осуществлялось селективное концентрирование патогена на магноиммуносорбенте, проводили иммуноферментный анализ. Во флаконы помещали 200 мкм исследуемой взвеси магноиммуносорбента. Контролем служили КМИС, не контактировавшие с пробой. Затем в опытные и контрольные флаконы вносили по 200 мкл иммунопероксидазного конъюгата, изготовленного нами, в его рабочем разведении, инкубировали 1 час при комнатной температуре, отмывали 3–4 раза 0,9% раствором хлорида натрия с твин–20, используя постоянный магнит. После этого вносили свежеприготовленный субстратный раствор. Реакцию останавливали внесением во флаконы стоп–реагента (рисунок 19). Учет результатов проводили визуально через 1–5 минут. При положительном результате происходило оранжево–коричневое окрашивание, при отрицательном – раствор ингредиентов реакции оставался бесцветным. Для учета результатов на колориметрическом анализаторе содержимое флаконов после остановки



реакции переносили в микропланшеты и снимали показания прибора при 492 нм. Положительным считали пробы, показатели цвета которых в 1,5 и более раз превышали контрольные.

На основе проведенных исследований установлено, что чувствительность чумного магноиммуносорбентного диагностикума, оцененная в ИФА, во всех проведенных опытах была не менее  $1 \times 10^2$  м.к. в пробе.

Специфичность препаратов позволяла проводить анализы без перекрестных реакций с исследованными гетерологичными микроорганизмами. Аналогичные результаты получены и с пробами почвы.

Кроме антительного магноиммуносорбентного хитозанкремнеземного сорбента был изготовлен антигенный КМИС, лигандом для получения которого служила Ф1 чумного микроба. Данный КМИС применяли для обнаружения специфических антител в экспериментальных сыворотках от лабораторных животных, зараженных чумой. Для проведения ИФА во флаконы вносили по 200 мкл 10% взвеси КМИС. Контролем служил магноиммуносорбент, не контактировавший с сыворотками. В опытные флаконы вносили по 100 мкл испытуемых сывороток в разведениях от 1:100 до 1:3200. Выдерживали при температуре при  $37^{\circ}\text{C}$  в течение 1 часа. Сорбент отмывали 3–4 раза фосфатным буфером с твином, удерживая его постоянным магнитом. Затем в опытные и контрольные флаконы вносили по 200 мкл рабочего разведения антивидового пероксидазного конъюгата, в который на 1 мл добавляли 10 мг БСА, выдерживали при температуре  $37^{\circ}\text{C}$  30 минут. Промывали, как описано выше, но не менее 5–6 раз, используя постоянный магнит. После чего во флаконы вносили по 200 мкл хромогенной смеси. Как только надосадочная жидкость слегка желтела, ее в количестве 200 мкл переносили в лунки планшета и останавливали реакцию 50 мкл стоп-реагента. Аналогичную операцию проводили с контролем. Для учета результатов производили измерения оптической плотности на приборе «Мультискан» при длине волны 492 нм. Ответ считали положительным при

превышении оптической плотности опытного раствора над контрольным в 1,5 и более раза.

Таким образом, нами показана принципиальная возможность применения хитозанкремнеземных иммуносорбентов с магнитными свойствами для диагностики чумы и индикации ее возбудителя в экспрессном иммуноанализе (ИФА).

## Выводы

1. Проведены исследования по синтезу композиционных магносорбентов методом формирования пористой структуры кремнезема в присутствии полимера хитозана, имеющих стандартные структурные характеристики – удельную поверхность в пределах 68-82 м<sup>2</sup>/г, объем пор 1,2-1,5 м<sup>3</sup>/г. При этом достигнут результат количественного регулирования магнитных свойств сорбентов с изменением величины удельной намагниченности насыщения от 4,3 до 17,4 МН, А х м<sup>2</sup>/кг, достигаемые увеличением содержания магнитной составляющей в составе магносорбентов.

2. Впервые разработана технология получения пористых магносорбентов из кремнеземного материала аэросила - А-380, хитозана и оксалата железа. Изучены их структурные характеристики, химический состав в сопоставлении с данными ИК-спектроскопии и спектроскопии диффузного отражения. Синтезированы элементосодержащие кремнеземные сорбенты методом молекулярного наслаивания и деструкционно-эпитаксиального осаждения для координационной иммобилизации белковых лигандов.

3. Проведены исследования по разработке технологии получения магноиммуносорбентов иммобилизацией на поверхности композиционных хитозанкремнеземных носителей чумных иммуноглобулинов и капсульного антигена чумного микроба (Ф1) методами окисления и бензохиноновым.

4. Использование хитозанкремнеземного композиционного иммуносорбента с магнитными свойствами с иммобилизованными на нем живыми микробными клетками *Y. pestis* EV в качестве инокулята при глубинном культивировании позволило существенно сократить время выращивания чумной вакцины (до 15 часов) при значительном увеличении выхода биомассы (на 40±5%) и повышении жизнеспособности микробных клеток (с 30% до 55%), при этом инокулят можно использовать многократно. Выращенная таким методом чумная вакцина соответствует всем требованиям нормативной документации.

5. Увеличение биомассы *Y. pestis* EV при глубинном культивировании с использованием магноиммуносорбентного инокулята существенно повышает выход капсульного антигена Ф1 за счет возможности его извлечения как из биомассы, так и из культуральной жидкости.

6. На основе хитозанкремнеземного магносорбента сконструированы высокочувствительные специфичные диагностические чумные тест-системы (антительная и антигенная) для иммуноферментного анализа. Установлено, что основным фактором повышения их чувствительности являются иммунохимические свойства магноиммуносорбента, определяемые качеством носителя, способом иммобилизации белкового лиганда.

## Заключение

С 90-х годов прошлого столетия начался подъем заболеваемости чумой в мире, который продолжается и в настоящее время. Наличие обширных природных очагов на территории многих государств мира, в том числе и России, социально-экономические различия этих стран и, как следствие, различие арсеналов методов профилактики и диагностики этой инфекции и борьбы с ней, возможность антропонозного выноса чумы на неэнзоотичные территории и тому подобные факторы не позволяют надеяться на полное искоренение чумы в природе в ближайшее время (Г.Г. Онищенко, А.М. Кокушкин, О.В. Кедрова и др., 1998; Г.Г. Онищенко, Б.Л. Черкасский, Ю.М. Федоров и др., 1998; Г.Г. Онищенко, 2002). После событий 11 сентября 2001 года в Нью-Йорке в одном ряду с возбудителями оспы, сибирской язвы, вирусами Эбола и Марбурга в списке наиболее вероятных и опасных агентов биотерроризма отмечен чумной микроб. Именно поэтому вопросам специфической защиты и экспрессным методам диагностики (индикации) этой инфекции уделяется столь пристальное внимание.

Одним из приоритетных научных направлений современной биотехнологии является разработка технологий на основе использования иммобилизованных форм биологических объектов, в первую очередь микроорганизмов и их метаболитов. Несмотря на большое количество работ, посвященных явлению иммобилизации, в настоящее время реализована лишь часть потенциальных возможностей данного направления.

Придание носителям биомолекул и клеток свойства магнитоуправляемости открыло новые перспективы применения иммобилизованных микробиологических систем (В.И. Ефременко, 1996; И.С. Тюменцева, 1996; Е.Н. Афанасьев, 2000).

Анализ литературных данных по синтезу биотехнологических сорбентов свидетельствует о том, что в данном направлении существует множество проблем, связанных с выбором сорбционных материалов,

поиском селективных лигандов, разработкой методов фиксирования лигандов на поверхности матриц. Решение вышеуказанных проблем возможно на основе целенаправленных исследований по разработке сорбентов, обладающих высокой специфичностью к определяемым биологически активным веществам и микроорганизмам, отличающихся стабильностью в условиях присоединения лигандов, а также обеспечивающих оптимизацию в процессах сорбции и десорбции (А.В. Брыкалов, 1993; В.Б. Алесковский, 2002).

В настоящее время для практических целей медицины, биотехнологии важное значение приобретают композиционные сорбенты, содержащие в качестве основного компонента кремнезем. Данные сорбенты могут быть с успехом использованы при конструировании твердофазных тест-систем для диагностики особо опасных инфекций, что является актуальным решением проблемы для медицины и ветеринарии (И.В. Жарникова, И.С. Тюменцева, А.В. Брыкалов, 1995).

Современные технологии синтеза органокремнеземных сорбентов включают четыре направления. Первое – основано на сорбции или хемосорбции полимеров из растворов на поверхности сорбентов, имеющих определенные структурные характеристики; второе – включает синтезы сорбентов, заключающиеся в радикальной или ионной полимеризации мономеров в присутствии кремнезема; третье направление – для получения объемно-модифицированных композиционных сорбентов предусматривает поликонденсацию кремнийорганических соединений. Способ и технологические аспекты получения композиционных сорбентов, основанные на формировании пористой структуры кремнеземной матрицы в присутствии полимеров (декстран, поливиниловый спирт) формируют четвертое направление по конструированию органокремнеземных сорбентов. Многочисленные публикации авторов (М.Т. Брык, 1981; Г.В. Кудрявцев, С.М. Староверов, 1989; В.Б. Алесковский, А.Я Юффа, 1989; А.В. Брыкалов,

1993; В.Б. Алесковский, 2002) содержат информацию по достоинствам и недостаткам каждого из направлений синтеза сорбента.

Целью начального этапа исследований по диссертационной работе являлось получение ферромагнитных сорбентов, обладающих заданным составом, адсорбционными и магнитными свойствами, используемыми для проведения твердофазного иммуноанализа микроорганизмов на основе методов ИФА. Одной из ключевых задач являлось применение магнитоуправляемых сорбционных материалов для глубинного культивирования вакцинного штамма чумного микроба.

Синтез магносорбентов с высокой сорбционной емкостью проведен методом формирования пористой структуры носителя в присутствии полимера хитозана. В качестве кремнеземного компонента использован высокодисперсный непористый кремнезем - аэросил А-380. В технологии получения сорбента применялся полисахарид хитозан, представляющий собой полностью дезацетилированный продукт - поли [(1-4)- 2-амино-2-дезоксид-β-D-глюкозы].

В строении хитозана выделяют два участка: упорядоченные участки, образованные противоположно заряженными звеньями полиэлектролитной системы, и участки, чередующиеся с дефектами. Наличие в хитозане двух гидроксильных и первичной аминогруппы расширяет возможности его модификации (Т.И. Тюпенко, 2001).

Технология получения хитозанкремнеземных магносорбентов включала восемь стадий. Стадии технологии 1-5 характеризуют процесс получения композиционного магносоорбента, а последующие стадии 6-8 – отражают этапы модифицирования поверхности сорбента функциональными группами: методом окисления, бензохиноновым, а также процессы иммобилизации антигена или антител с последующей стабилизацией КМИС. Технологии синтеза магноиммуносорбента подробно представлены в главе 3 диссертации.

В качестве магнитного компонента при синтезе применялся магнетит ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ), а также разработан способ получения магносорбента путем введения на стадии получения гидрогеля оксалата железа (II).

Структура композиционных сорбентов представлена корпускулярной системой, которая состоит из частиц кремнезема, покрытых полимером хитозана. Размер корпускул определяет величину удельной поверхности, а плотность их упаковки – объем и радиус пор. Механизм образования пористых хитозанкремнеземных магносорбентов можно представить, как сложный процесс, сопровождающийся формированием корпускулярной структуры кремнеземного остова из непористых частиц аэросила А-380, и включением в него органического полимера хитозана и магнетита.

При сравнительном анализе данных этих двух методов следует отметить, что с использованием в качестве компонента для синтеза сорбентов оксалата железа получаемые магносорбенты имеют несколько меньшую удельную поверхность и большее значение объема пор. Это объясняется, по-видимому, разрыхляющим и активирующим влиянием газообразных продуктов, выделяющихся при разложении оксалата железа, с образованием  $\text{FeO}$ , далее  $\text{Fe}_2\text{O}_3$  и магнетита.

Синтезированные нами хитозанкремнеземные магносорбенты имели следующие стандартные структурные характеристики – удельную поверхность в пределах  $68\text{--}82 \text{ м}^2/\text{г}$ , объем пор  $1,2\text{--}1,5 \text{ м}^3/\text{г}$ . При этом достигнут результат количественного регулирования магнитных свойств сорбентов с изменением величины удельной намагниченности насыщения от  $4,3$  до  $17,4 \text{ МН}$ ,  $\text{А} \times \text{м}^2/\text{кг}$ , достигаемые увеличением содержания магнитной составляющей в составе магносорбентов.

Разработана технология получения элементсодержащих кремнеземных сорбентов на основе аэросила А-380 методом деструкционно-эпитаксиального осаждения (ДЭО), ранее используемого для модифицирования силикагеля такими химическими элементами, как медь, цинк, кобальт, магний, марганец (В.Б. Алесковский, 2001).



Для синтеза элементсодержащих кремнеземных сорбентов к 4 г аэросила А-380 добавляли 100 мл 0,15 М растворов соответствующих для каждого отдельного синтеза солей  $\text{CuSO}_4$ ,  $\text{MgSO}_4$ ,  $\text{CoSO}_4$ ,  $\text{MnSO}_4$ ,  $\text{FeCl}_2$  в 0,25 М растворе водного аммиака. Суспензию выдерживали в течение 24 часов при  $230^\circ\text{C}$ . Далее сорбент отмывали дистиллированной водой до нейтральной реакции в промывных водах, высушивали при температуре  $95\text{--}110^\circ\text{C}$  в течение 2 часов. Затем сорбент измельчали и методом рассева выделяли фракцию с размером частиц 80-120 мкм.

Количественный химический анализ полученных сорбентов подтвердил образование поликремневых солей химических элементов, таких как медь, магний, марганец, кобальт, и процесс образования модифицированных кремнеземов согласуется с механизмом, предложенным в работе (В.Б. Алесковского, 2001).

При определении концентрации Бренстедовских кислотных центров и констант равновесия  $K_{\text{ср}}$  для образцов сорбентов, полученных методом формирования пористой структуры кремнезема в присутствии полимеров декстрана и хитозана, а также элементсодержащих сорбентов, синтезированных методом деструкционно-эпитаксиального осаждения, показано, что композиционные органокремнеземные сорбенты, по сравнению с исходным аэросилом А-380, имеют меньшие значения концентрации протодонорных кислотных центров  $B_0$  и констант равновесия. Данную закономерность можно объяснить тем, что при синтезе органокремнеземных сорбентов в процессе формирования корпускулярной структуры полимеры декстран и хитозан частично экранируют Бренстедовские центры кремнеземной матрицы. При синтезе композиционных сорбентов, содержащих  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ , вводимый до массового количества 15% относительно общей массы получаемого композиционного сорбента, наблюдается усиление кислотных свойств поверхностных центров модифицированных кремнеземов. Кроме того, введение в состав композиционного сорбента  $\text{Fe}_2\text{O}_3$  приводит к уменьшению на 25-30% удельной поверхности сорбентов,

что, вероятно, обусловлено стабилизирующим действием оксида железа (II), проявляющимся в противодействии процессу, связанному с укрупнением корпускулярных частиц в структуре модифицированного кремнезема.

Синтез элементсодержащих кремнеземных сорбентов методом деструкционно-эпитаксиального осаждения, в отличие от общеизвестных методов синтеза твердых веществ, протекает не путем хаотичного междуатомного и межмолекулярного взаимодействия, а путем переноса и закрепления на заранее подготовленной поверхности каждый раз только одних, избранных структурных единиц. Данным методом по оригинальному синтезу получены магносорбенты, обладающие магнитными свойствами.

Таким образом, в результате проведенных исследований получен набор композиционных сорбентов с оптимизированным составом и структурными характеристиками, изучены их спектральные характеристики, микроструктура поверхности, кислотные свойства, что позволяет целенаправленно использовать сорбционные материалы для последующего получения на их основе специфичных иммуносорбентов.

Химическое модифицирование дисперсных твердых тел представляет собой процесс изменения химического состава поверхностного слоя в заданном направлении.

С целью дальнейшего активирования композиционных сорбентов функциональными группами нами разработаны три варианта модифицирования носителей: бензохиноновый, окислением и с применением глутарового альдегида.

Одним из важнейших условий получения магноиммуносорбентов с высоким уровнем емкости, специфичности и чувствительности является выбор эффективных методов иммобилизации лигандов.

Иммобилизацию иммуноглобулинов на поверхности магносорбентов проводили следующим образом: к 0,2 мл 10% взвеси магносорбента приливали 1 мл иммуноглобулинов чумных, варьируя количество белка от

0,5 до 10 мг/мл, ковалентное связывание проводили в течение 1-24 часов, при температуре 5<sup>0</sup>С; 22+4<sup>0</sup>С и 38<sup>0</sup>С.

В соответствии с экспериментальными данными, оптимальными факторами, которые обеспечивают получение иммуносорбентов, обладающих высоким уровнем специфической активности и чувствительности, являются следующие: время иммобилизации специфических иммуноглобулинов 1,5 часа при значении рН раствора белка 6-8 и температуры от 5 до 22<sup>0</sup>С.

На основе хитозанкремнеземных сорбентов, активированных бензохиноном и окислением перхлоратом натрия, разработаны эффективные композиционные магноиммуносорбенты, имеющие преимущества по уровню чувствительности и специфичности, технологичности получения перед глутаральдегидным методом получения активированных сорбционных материалов. В данном случае проявились недостатки этого метода, связанные с тем, что глутарового альдегида практически не существует в мономерном виде (Р. Monson, 1978), и это приводит к неконтролируемости процесса активирования поверхности сорбента, а также к нестандартности в синтезе активированного магносорбента по количеству альдегидных групп. Магноиммуносорбенты, получаемые бензохиноновым методом и окислением, при хранении (4<sup>0</sup>С) сохраняли стабильность свойств в течение одного года (срок наблюдения).

Одним из современных направлений научных исследований в области биотехнологии является использование иммобилизованных клеток. Иммобилизация биообъекта способствует увеличению продуктивности и производительности биотехнологического процесса, стабилизации свойств продуцента, возможности использования и быстрого удаления микробиологической системы из зоны культивирования (Н.С. Егоров, А.В.Олескин, В.Д.Самуилов, 1987; А.П.Синицын, Е.И.Райкина, В.Н. Лозинский и др., 1994; И.В. Владимцева, 2002; J.Naihu, 1987). Магнитное манипулирование микроорганизмами – продуцентами, фиксиро-

ванными на магнитных носителях, весьма перспективно, однако до настоящего времени разработке этих технологий уделялось мало внимания. Это и определило характер следующего направления наших исследований: изучение возможности и эффективности использования хитозанкремнеземного магноиммуносорбента для глубинного культивирования вакцинного штамма *Y.pestis EV*. Лигандом для получения МИС служили иммуноглобулины G, выделенные из гипериммунной кроличьей сыворотки крови, полученной при иммунизации животных водорастворимыми антигенами, изолированными из биомассы *Y.pestis EV*, выращенной при  $(27\pm 1)^{\circ}\text{C}$ . Для получения иммобилизованных на магнитном носителе бактериальных клеток использовали производственную культуру вакцинного штамма *Y.pestis EV*. После контакта микробных клеток с магнитным носителем происходила прочная иммобилизация чумного микроба на поверхности магнитоуправляемого хитозанкремнеземного иммуносорбента на основе реакции «антиген-антитело».

Магноиммуносорбент с фиксированными микробными клетками вносили в лабораторный ферментер (ЛКВ, Швеция) и использовали в качестве инокулята, который удерживали на соленоиде путем создания электромагнитного поля. Для выращивания микробной взвеси в ферментере в качестве питательной среды использовали бульон Хоттингера pH  $(7,1\pm 0,1)$ , инкубирование проводили при температуре  $(27\pm 1)^{\circ}\text{C}$  дискретным добавлением глюкозы согласно РП №702-97.

Контролем служило глубинное культивирование *Y.pestis EV* по методике периодического выращивания в ферментере без иммобилизованного сорбента.

Анализируя динамику накопления биомассы производственного штамма *Y.pestis EV* в процессе глубинного культивирования с использованием магнитоуправляемых иммобилизованных систем, можно отметить, что при первом выращивании lag-фаза в среднем длилась 8-9 часов, после чего наступала экспоненциальная фаза, во время которой

отмечались интенсивный рост и размножение клеток. Через 18-20 часов наступала стационарная фаза роста, в начале которой производили слив культуральной жидкости, оставляя соленоид в рабочем состоянии. В сосуд заливали свежую порцию бульона Хоттингера и проводили повторное выращивание биомассы, не внося дополнительное количество инокулята. Так повторяли пять раз.

Анализ динамики роста повторных выращиваний иммобилизованных клеток вакцинного штамма чумного микроба показал, что lag-фаза практически отсутствовала, а стационарная фаза роста наступала через  $(15 \pm 1)$  часа. При этом «урожай» биомассы при первом и повторных глубинных культивированиях был фактически одинаковым и составил в среднем  $7 \times 10^{10}$  м.к./мл среды. По сравнению с контролем (без иммобилизованного инокулята) количество биомассы увеличивалось на  $40 \pm 5\%$ . Описанные эксперименты были проведены на пяти сериях ферментативного бульона Хоттингера.

Изучение свойств вакцинного штамма *Y.pestis EV*, выращенного в условиях глубинного аппаратного культивирования при использовании иммобилизованного на магнитном сорбенте инокулята, проводили в соответствии с ФС 42-3877-99. Морфологические, тинкториальные, биохимические свойства, иммуногенность, термостабильность вакцины соответствовали НД. Результаты изучения жизнеспособности (опытных и контрольных образцов) свидетельствуют, что при глубинном культивировании в электромагнитном поле с использованием иммобилизованного инокулята на магнитном носителе процент живых микробных клеток достигает не менее  $(55,4 \pm 5,8)\%$ , в то время, как в контрольных образцах этот показатель – не более  $(30 \pm 5)\%$ .

Вышеизложенное дает основание высказаться в пользу перспективности использования этого способа глубинного культивирования при производстве живой чумной вакцины.

Кроме того, при глубинном культивировании чумного микроба появляется возможность использовать как микробную биомассу, так и культуральную жидкость для получения его капсульного антигена (Ф1), что значительно увеличивает выход целевого продукта высокого качества, который является основой при конструировании различных чумных иммунобиологических препаратов.

Методы твердофазного ИФА основаны на использовании серологически активных компонентов, иммобилизованных на нерастворимых носителях, что обеспечивает их быстрое и эффективное разделение. Чувствительность и специфичность ИФА обусловлена не только степенью чистоты и активности используемых ингредиентов, но и свойствами твердой фазы, которая должна сохранять иммунологические свойства и стабильность в иммобилизованном состоянии, обладать минимальной активностью, неспецифически связывать компоненты анализируемой системы.

Проведенные эксперименты показали, что хитозанкремнеземный магносорбент полностью отвечает перечисленным требованиям.

Синтезированный нами композиционный магносорбент, активированный перхлоратом натрия, был использован в качестве матрицы при конструировании антительной и антигенной чумной диагностических тест-систем для иммуноферментного анализа. При этом лигандами служили иммуноглобулины G выделенные из гипериммунной чумной кроличьей сыворотки, и Ф1 чумного микроба, изолированная из культуральной жидкости изоэлектрической преципитацией.

Чувствительность чумного антительного магноиммуносорбентного диагностикума, оцененная в ИФА, всех изготовленных серий была не менее  $1 \times 10^2$  м.к. в пробе. Специфичность препаратов позволяла проводить анализы без перекрестных реакций с исследованными гетерологичными микроорганизмами. Изготовленный нами антигенный КМИС обладал высокой чувствительностью при выявлении специфических антител.

## Список использованных источников

1. Айлер, Ю.П. Планирование эксперимента при поиске оптимальных условий / Ю.П. Айлер, Е.В. Макарова. - М.: 1976.-146с.
2. Айлер, Р. Химия кремнезема / Р. Айлер. - М.: Мир, 1982.-127с.
3. А.С. №1425910 А61К 39/02. Способ получения туляремийного антигена / Н.Ф. Василенко, И.В. Кронгауз, О.Н. Лопатин, Т.И. Башлова, И.В. Жарникова.–1988.
4. Албулов, А.И. Применение хитозана в ветеринарии для лечения и профилактики желудочно-кишечных заболеваний молодняка сельскохозяйственных животных / А.И. Албулов, А.Я. Самуйленко, Н.Э. Нифатьев // Матералы V конференции «Новые перспективы в исследовании хитина и хитозана». – М,1999.- С. 115-117.
5. Алесковский, В.Б. Стехиометрия и синтез твердых соединений / В.Б. Алесковский - Л: Высшая школа, 1976.-2 18с.
6. Алесковский, В. Б. Химия твердых веществ / В.Б. Алесковский. - М.: Высшая школа, 1978.-350с.
7. Алесковский, В.Б. Модифицирование поверхности неорганическими соединениями / В.Б. Алесковский, А.Я. Юффа // Журн. Всес. хим. об-ва им. Д.И.Менделеева. -1989-№3. - С.317-324.
8. Алесковский, В.Б. Химия высокоорганизованных веществ // Химия высокоорганизованных веществ и научные основы биотехнологии: Автореф. Докл. III Междунар. Конф. /СПбГУ.–Санкт-Петербург, 2001, – С.7–13
9. Анапова, Е.В. Обнаружение возбудителя туляремии у больных с помощью реакции иммунофлуоресценции / Е.В. Анапова, Л.С. Каменова, И.С. Мещерякова //ЖМЭИ.–1989.–№4.–С.46–49.

10. Апарин, Г.П. Микробиология чумы / Г.П. Апарин, Е.П. Голубинский // Руководство.- Иркутск.- 1989.- 90с.

11. Афанасьев, Е.Н. Научно-методические аспекты экспресс-диагностики возбудителей особо опасных зоонозных инфекций (чума, бруцеллез, сибирская язва) // Автореф. Дис.... докт. мед. наук / Е.Н. Афанасьев Ставрополь 2000, –с.450.

12. Бактериологический метод определения концентрирующей способности магнитных иммуносорбентов / С.Д. Гавенский, В.И. Ефременко, И.М. Климова, В.Г. Пушкарь, В.Ю. Перов // Сб. науч. работ.– Волгоград, 1989. – Выш.4, – С.23–27.

13. Бебрис, Н.К. - Получение чистого макропористого кремнезема аэросила - адсорбента для газовой хроматографии / Н.К. Бебрис, А.В. Киселев, Ю.С. Никитин // Коллоид. журн.-1967.-Т.29, №3. – С. 326-332.

14. Бельская, Н.А. Микрометод фракционирования и индентификации белков бактерий / Н.А. Бельская, В.С. Митина, В.И. Вейнблат // Материалы Северо-Кавказской биохим. конф.- Махачкала, 1970.- С. 270-271.

15. Бельская, Н.А. Микрометод фракционирования и индентификации белков бактерий / Н.А. Бельская, В.С. Митина, В.И. Вейнблат // Лаб. дело.- 1972.- №10.- С. 514-516.

16. Березкин, В.Г. Твердые носители в газовой хроматографии / В.Г. Березкин, В.Г. Пахомов, К.И. Сакодинский. - М.: Химия, 1975. - 210с.

17. Богатский, А.В. Иммобилизация протеиназы Е и П на поверхности аминорганокремнезема / А.В. Богатский, Т.И. Давиденко, А.В. Чуенко // Укр. биохим. журн.-1979.-Т. 51., №4.-С. 315-318.



18. Богданов, В.Д. Структурообразователи в технологии рыбных продуктов / В.Д. Богданов.-М.: ВНИЭРХ, 2001.- сер.3.-высш.3.-С.11-20.

19. Бойцова, Т.М. Обоснование и разработка ресурсосберегающих технологий рыбофарма и пищевых продуктов на его основе // Автореферат дис. ... д-ра техн. наук / Т.М. Бойцова .- Владивосток, 2002.-24с.

20. Брей, В.В. Теоретическая и экспериментальная химия / В.В. Брей. – М.: 1982. -Т.18, №1.-С.122-125.

21. Брык, М.Т. Полимеризация на твердой поверхности неорганических веществ / М.Т. Брык - Киев: Наукова Думка. - 1981. - 271с.

22. Брыкалов, А.В. Сорбенты, на основе кремнеземов и активированных углей в биотехнологии и медицине / А.В. Брыкалов // Мат. конф. химиков Сев. Кавказа. - Нальчик, 1991.-С. 185-186.

23. Брыкалов, А.В. Получение биопрепаратов на основе методов - аффинной сорбции и иммобилизации // Дис. ... д-ра хим. наук / А.В. Брыкалов. -1993,СПб. - 330с.

24. Брыкалов, А.В. Метод получения магнитоиммуносорбентов для диагностических тест-систем / А.В. Брыкалов, И.В. Жарникова, И.С. Тюменцева // Сб. стр. 58 науч.- метод, конф. СГМИ. - Ставрополь, 1995.- С. 19-20.

25. Брыкалов, А.В. Новые композиционные носители для иммобилизации ферментов / А.В. Брыкалов, О.В. Воробьева // Современные достижения биотехнологии: Материалы Всерос. конф. - Ставрополь. 1996.- С.279.

26. Брыкалов, А.В. Разработка твердофазной тест-системы для диагностики хеликобактер пилори / А.В. Брыкалов, О.В. Во-

робьева, В.Д. Пасечников // Современные достижения биотехнологии: Материалы Всерос. конф.- Ставрополь, 1996.-С.274.

27. Быков, И.П. Состояние и перспективы развития производства хитина, хитозана и продуктов на их основе из панциря ракообразных / И.П. Быков.- М., 1999.- С. 15-18.

28. Владимцева, И.В. Использование магнитных сорбентов в медицине и биотехнологии / И.В. Владимцева, А.А. Степин // Молекулярная биология и медицина: Тез.докл.научн.конф.–Ленинград, 1990.–С.32.

29. Варламов, В.П. Место российской науки в мировом хитозановом буме / В.П. Варламов.- М., 1999.- С. 7-8

30. Вейнблат, В.И. Иммуноэлектрофорез антигенов чумного микроба / В.И. Вейнблат, В.В. Каминский, Л.С. Орлова // Проблемы особо опасных инфекций.- Саратов, 1972.- Вып.4(26).- С. 196-200.

31. Вейнблат, В.И. Антигены *Y.pestis* (биохимические и иммунологические аспекты) // Дис. ... д-ра мед. наук /В.И. Вейнблат .- Саратов, 1974.-324с.

32. Вейнблат В.И. К вопросу разработки и стандартизации препаративных методов получения очищенных антигенов возбудителя чумы / В.И. Вейнблат, М.С. Веренков, С.М. Дальвадянц // Биохим. Парафизиол. и микробиология особо опасных инфекций.- Саратов, 1983.- С. 38-42.

33. Вейнблат В.И.. Методы получения и очистки капсульного антигена и эндотоксина возбудителя чумы / В.И. Вейнблат, С.М. Дальвадянц, М.С.Веренков // Лабор. дело, 1983. №12.- С. 37-39

34.Вершилова, П.А., Эпидемиология бруцеллеза / П.А. Вершилова, А.А. Голубева // Бруцеллез.–М.: Медицина, 1972.–С.319–347.

35. Веселова, И.А. Использование хитозана и его производных для иммобилизации ферментов / И.А. Веселова, Т.Н. Шеховцова, Г.А. Бадун // Новые перспективы в исследовании хитина и хитозана: Материалы Пятой конференции – М.: 1999.–с.265–267.

36. Владимцева, И.В. Научно-методические аспекты приготовления и использования магнитоуправляемых иммобилизованных микробиологических систем // Дис.... д-ра биол. наук / И.В. Владимцева. – Ставрополь, 2002.–304с.

37. Воронков, М.Г. Кремний и жизнь / М.Г. Воронков, Р.И. Зельчан, Э.Я. Луковец - Рига: Зинотне, 1978.-587с.

38. Вудворд, Д. Иммобилизованные клетки и ферменты / Д. Вудворд М.: Мир, 1988.- 161с.

39. Гибридомы, синтезирующие моноклональные антитела к полисахаридному антигену возбудителя туляремии / Е.Г. Чернявская, П.Г. Свешников, Е.С. Северин, Н.Ф. Василенко // Особо опасные инфекционные заболевания: Сб. науч.работ.–Волгоград, 1990.– в. 4. – С.254–258.

40. Голубинский, Е.П. Обнаружение фракции 1 чумного микроба ферментным иммунологическим методом / Е.П. Голубинский, В.С. Рудник, М.П. Рудник // Проблемы изучения механизмов эпизоотии чумы: Тез. Докл. Всес. Конф.– Саратов, 1980–С.9.

41. Голубинский, Е.П. Применение иммуноферментного метода для обнаружения антигенов туляремийного микроба антител к ним у людей и эпизоотологическим обследованиям / Е.П. Голубинский, С.П. Меринов, Л.В. Меринова // Современные аспекты профилактики зоонозных инфекций. – Иркутск, 1984.–№2. –С.129.

42. Горовой , Л.Ф. Хитозансодержащие материалы, получаемые из грибной биомассы / Л.Ф. Горовой // Материалы пятой кон-

ференции перспективы в исследовании хитина и хитозана».- М.: Издат, 1999.- С. 130-133.

43. Грядских, Д.А. Композиционные сорбенты для иммобилизации микроорганизмов / Д.А. Грядских //Современные достижения биотехнологии: Мат.Всерос.конф. - Ставрополь, 2002, –с.68–69.

44. Грядских, Д.А. Магноиммосорбенты для глубинного культивирования чумного микроба / Д.А. Грядских, И.С. Тюменцева, Е.Н. Афанасьев // Биотехнология 2003: Мат.Всерос. конф. - Сочи, 2003.–С.79.

45. Девдариани, З.Л. Научно-методические основы конструирования моноклональных иммуноглобулиновых реагентов с использованием гибридной технологии // Дис. ... д-ра мед. наук / З.Л. Девдариани.- Саратов,1993.- 52 с.

46. Домарадский, И.В. Чума: современное состояние, гипотезы, проблемы / И.В. Домарадский.- Саратов, 1993.- 129 с.

47. Дрантиев, Б.Б. Современное состояние и перспективы развития иммуноферментного анализа / Б.Б. Дрантиев, А.М. Егоров // Журнал.Всес.химич. об-во им.Д.И.Менделеева.–1982.–т.27, №4.- С.82–89.

48. Егоров, Н.С. Биотехнология /Н.С. Егоров, А.В. Олескин, В.Д. Самуилов // Проблемы и перспективы биотехнологии.- М.: Высшая школа.- 1987.- 115 с.

49. Ефременко, В.И. Магнитосорбенты в микробиологических исследованиях. Применение магнитных сорбентов в иммуноферментном и радиоиммунном анализах (обзор литературы) / В.И.Ефременко, И.С. Тюменцева // Деп. в ВИНТИ 26.12.95, №344-В95.

50. Ефременко, В.И. Магносорбенты в микробиологических исследованиях / В.И. Ефременко. – Ставрополь, 1996.–130с.

51. Жакот, Р.А. Иммобилизация ферментов на силикатных носителях / Р.А. Жакот, А.С. Корсакевич // Успехи биолог, химии.- 1977.-Т. 18. - С.140-161.

52. Жарникова И.В. Использование композиционных иммуноферментов в реакции иммунофлуоресценции (РИФ) для экспресс-диагностики возбудителей ООИ / И.В. Жарникова, А.В. Брыкалов, И.С. Тюменцева // Акт вопросы профилактики чумы и других инфекционных заболеваний: Матер.науч.-практич.конф.посвященная 100-ю открытия возбудителя чумы.– Ставрополь, 1994.– С. 224–225

53. Жарникова, И.В. Разработка технологии композиционных магноиммуносорбентов и конструирование на их основе диагностических тест-систем для иммуноанализа возбудителей чумы и туляремии // Автореф.Дис. .... канд.биолог. наук / И.В. Жарникова .- Ставрополь, 1995.- 22С.

54. Жоголев, К.Д. Препараты на основе хитина и хитозана в медицине и рациональном питании / К.Д.Жоголев, В.Ю.Никитин, В.Н.Цыган. – МПб,2000.– 32с.

55. Журавлев, В.И. Опыт применения реакции энзиммеченных антител в практике эпизоотологического обследования природных очагов чумы / В.И. Журавлев, А.Т. Яковлев, В.С. Рыбкин // ЖМЭИ, 1983, №11.- С.116–117.

56. Зайцев, Т.Н. Математический анализ биологических данных /Т.Н.Зайцев. – М.: Наука, 1991.–184с.

57. Закревский, В.И. Иммуносорбенты их применение в иммунологии микроорганизмов / В.И. Закревский //ЖМЭИ.–1980.–№4.– С.9–15.

58. Звягинцев, Д.Г. Взаимодействие микроорганизмов с твердыми поверхностями / Д.Г. Звягинцев – М: Изд.МГУ, 1973–1976 с.

59. Зыкин, Л.Ф. Иммуноферментный анализ в лабораторной диагностике некоторых опасных инфекций. ИФА при чуме / Л.Ф. Зыкин, А.Т. Яковлев // Очерки по лабораторной диагностике особо опасных инфекций.- Саратов: Сарат. ун-та.- 1993.- С. 10-15.

60. Зыкин, Л.Ф. Очерки по лабораторной диагностике опасных инфекций / Л.Ф. Зыкин, А.Т. Яковлев. – Саратов, 1993.–109с..

61. Изучение сорбционной способности полистирольных планшетов, используемых в иммуноферментном анализе / Л.И. Ванеева, И.Ю. Гридина, О.Н. Пантелеева и др., // ЖМЭИ.- №9.- 1989.- С. 86-89.

62. Ильин, А.В. Ацетилирование низкомолекулярного водорастворимого хитозана /А.В.Ильин, В.П.Варламов//Новые достижения в исследовании хитина и хитозана: Материалы Международной конференции.- Москва,2001.- С.280-283.

63. Иммуобилизованные клетки микроорганизмов / А.П. Синицын, Е.И. Райкина, В.Н. Лозинский, С.Д. Спасов // М.: Изд-во МГУ, 1994.- 228с.

64. Использование инфракрасной спектроскопии для изучения химического состава чумного и псевдотуберкулезного микробов / Т.М. Тараненко, С.М. Дальвадяц, Т.П. Боровикова, И.Ф. Ковалев, В.С. Дернова // Пробл. особо опасн. инф., 1972.- Вып.1(23).- С. 37-41.

65. Иммуноферментный анализ / Под ред. Г.Т. Нго, Г.М. Ленхофор.-М.: 1988.-С.25–167.

66. Использование магнитоуправляемых иммуобилизованных систем для глубинного культивирования / И.В. Владимцева, М.В. Самыгин, А.А. Степин, О.В. Колотова // Биотехнология, –2001, №4.–с.74–78.

67. Исследование структуры гидроксильного покрова пиро-генного кремнезема методами ИК-спектроскопии и масс-спектрометрии / В.В.Брей, Н.И.Горлов, Э.Н.Король, В.В.Стрелко // Теорет. и эксперим. химия. -1982, №1.-С. 122-125.

68. Исследование кислотных свойств силохрома с-120, модифицированного элемент оксидными слоями методом молекулярного наслаивания / А.В.Брыкалов, С.И.Кольцов, В.И.Ковальков и др. // Журн.физ.химии, – 1986. т.60. –№4.–С. 950–952.

69. Калинина, О.А. ИФА в серодиагностике сифилиса / О.А. Калинина, И.В. Емельянова, М.Ф. Лактионова // Современные вопросы дерматовенерологии: Сб. юбил. науч. тр. посвящ., 70-летию обл. кож.-вен.дисп. г. Курска.- Курск.- 1997.- С. 65-67.

70. Карнаухов, А.П. Глобулярная модель пористых тел корпускулярного строения / А.П. Карнаухов // Кинетика и катализ.- 1971. - т. 12, №4.- с. 1025-1033.

71. Карпенко, В.В. Обезболивание животных в эксперименте / В.В. Карпенко, В.И. Сачков // Метод. рек.- М., 1985.- 53с

72. Картель, Н.Т. Новые критерии оценки свойств сорбентов медицинского назначения / Н.Т. Картель, Е.Д. Молюк, М.Е. Чудновский // тез. IV республ. конф. по сорбентам мед. назначения– Донецк, 1988.–С.14–15.

73. Касторная, М.Н. Бруцеллез / М.Н. Касторная, Е.Н. Афанасьев, И.С. Тюменцева // Лабораторная диагностика.–Дет. в ВИНТИ 21.08.00.№148–151.

74. Касторная, М.Н. Конструирование диагностических препаратов для экспрессных методов лабораторной диагностики бруцеллеза и детекция его возбудителей // Дис.... канд.биол.наук / М.Н. Касторная.- Ставрополь, 2003.–180с.

75. Киселев, А.В. Влияние температуры гидротермальной обработки на изменение пор и скелета промышленного силикагеля / А.В. Киселев, В.М. Лукьянович, Ю.С. Никитин. // Коллоид. журн.-1969.-Т.31, №3. С.388-393.

76. Киселев, А.В. – Инфракрасные спектры поверхностных соединений. /А.В.Киселев, В.И.Лыгин.–М.: Наука, 1972.–459с.

77. Климова, В.А. Основные методы анализа органических соединений / В.А. Климова. – М.: Химия, 1971. –С.159–161.

78. Климова, И.М. Магнитный иммунофермент анализ антигенов *Yersinia pestis* / И.М. Климова, В.И. Ефременко, В.Г. Пушкарь // ЖМЭИ.– 1989. –№7. –С. 62–65.

79. Климова, И.М. Способ получения МИС: Патент №5040754 РФ, А в/к 39/385 с.12. № 11/00 //01, заявл.29.04.92. опубл.7.06.95.

80. Клячко–Гурвич, А.А. Методы определения удельной поверхности / А.А. Клячко–Гурвич. – М.: 1961, –№10.–с.1885.

81. Ковальков, В.И. Синтез протонодонорных групп на поверхности высоко дисперсного углерода / В.И. Ковальков, Е.П. Смирнов, С.И. Кольцов //Журн. общ. Химия, 1976. - Т. №9.- С.2151.

82. Коликов, В.М. Хроматография биополимеров на макропористых кремнеземах / В.М. Коликов, Б.В. Мчедлишвили. - Л.: Наука, 1988.- С.189.

83. Кольцов, С.И. Силикагель, его строение и физико-химические свойства / С.И. Кольцов, В.Б. Алесковский. - Л.: Госхимиздат, 1953.- С.94-98.

84. Кольцов, С.И. Изучение взаимодействия трихлорсилана с силикагелем / С.И. Кольцов // Журн. прикл. химии., 1965.- Т.38, №6.- С.1384-1389.



85. Кольцов, С.И. Изучение стехиометрии продуктов реакции трихлорсилана с функциональными группами поликремнекислоты / С.И. Кольцов, Г.Н. Кузнецова, В.Б. Алесковский // Журн. прикл. химии. – 1967. – Т.47.№1. – С.70-72.

86. Кольцов, С.И. Изучение влияния носителей на свойства катализаторов / С.И. Кольцов, В.М. Смирнов, В.Б. Алесковский // Кинетика и катализ.-1970.-Т.11,№4.-С.1013-1021.

87. Кольцов, С.И. Изучение влияния носителя на свойства катализатора / С.И. Кольцов, В.М. Смирнов, В.Б. Алесковский // Кинетика и катализ. - 1973.- Т.14, №5.-С.1300-1303.

88. Красавцев, В.Е. Криль как сырьевая основа хитинового производства /В.Е. Красавцев // Материалы исследования хитина «хитозана».-М.,1999.- С. 35-37.

89. Кудрявцев, Г.В. Структура привитого слоя модифицированных кремнеземов / Г.В. Кудрявцев, С.М. Староверов // Журн. Всес. хим. об-ва им. Д.И.Менделеева. – 1989, №3- С.308-316.

90. Куфлина, С.А. Эвтаназия экспериментальных животных / С.А. Куфлина, Т.Н. Павлова // Метод. рек.по выведению животных из экспериментов.- М., 1985.- 9с.

91. Лабинская, А.С. Практикум по микробиологическим методам исследования / А.С. Лабинская. – М.: Медизд. 1963.–С.425–446.

92. Лившиц, В.С. Полимерные покрытия на раны и ожоги / В.С. Лившиц //Химикофармацевтический журнал.- 1988, №7. – С. 790-798.

93. Лисичкин, Г.Д. Достижения и перспективы химического модифицирования поверхности минеральных веществ / Г.Д. Лисичкин // Журн. Всес. хим. об-ва им. Д.И.Менделеева.-1989.Т.34. №3.- С.291-297.

94. Лисичкин, Г.Д. Достижения и перспективы химического модифицирования поверхности минеральных веществ / Г.Д. Лисичкин // Журн. Всес. хим. об-ва им. Д.И. Менделеева.-1989.-Т. 34, №3.- С.219-297.

95. Малыгин, А.А. О химическом составе продуктов взаимодействия хромсодержащего кремнезема с оксихлоридом ванадия / А.А. Малыгин // Журн. общ. химия. -1979.-№8-С.1686-1690.

96. Малыгин, А.А. Химическая сборка материалов с заданными свойствами / А.А. Малыгин. - Л.: Наука, 1986.- 49с.

97. Манолов, А.Д. Радиоиммунологический анализ при изучении персистенции чумного антигена в организме грызунов и у эктопаразитов природных очагов Сибири / А.Д. Манолов, Л.Ф. Зыкин, Е.П. Голубинский // ЖМЭИ.-1991.-№3.-С.44-47.

98. Мельник, И.В. Применение хитозана и его производных для концентрирования баксуспензий / И.В. Мельник, Н.Д. Скичко, Е.А. Шубина.-М., 1999.- С. 170-171.

99. Методы практической биохимии / Под ред. В.Уильямсона. - М.: Мир, 1978.-268с.

100. Мещерякова, И.С. Использование иммуноферментного метода Slisa выявлению возбудителей туляремии / И.С. Мещерякова, И.С. Умнова, К.А. Шаханина // Актуальные вопросы иммунодиагностики особо опасных инфекций – Ставрополь, 1986. – 4.1-С.216-218.

101. Мирясова, Л.В. Метод культивирования коклюшных бактерий / Л.В. Мирясова // Лаб.дело. 1999, №10. – С.31-34.

102. Неймарк, Н.Е. Синтетические минеральные адсорбенты и носители катализаторов / Н.Е. Неймарк. – Киев: Наукова Думка, 1982. – 210 с.

103. Немцев, С.В. Промышленное производство хитозана из панциря карапакса охотоморских крабов / С.В. Немцев, В.С. Божко // Материалы исследования хитина «хитозана».- М., 1999.- С. 51-52.

104. Нечипоренко, А.П. Микроскелетрофическое исследование титанооксидных слоев, синтезированных методом молекулярного наслаивания / А.П.Нечипоренко, Г.К.Шевченко, С.И.Кольцов. //Журн.прил.химии.–1981.–т.54.–№1.–С.1260–1264.

105. О применении твердофазного иммуоферментного метода для определения туляремийного антигена /Н. Ф. Василенко, Л.И. Заревина, А.И. Мирошниченко, О.Н. Лопаткин, Г.И. Башкова // Актуальные вопросы диагностики особо опасных инфекций: Тез. Докл. Всес.- конф.- Ставрополь, 1988.- вып. 4.1. – С. 53-56.

106. Обнаружение антигенов бруцелл с помощью частиц коллоидных металлов в качестве маркеров специфических антител / Т.Ю. Загоскина, Е.Ю. Марков, А.И. Калиновский, Е.П.Голубинский // ЖМЭИ. – 2001.–№3.–С.65–69.

107. Оккерс, К. Пористый кремнезем / К. Оккерс // Строение и свойства адсорбентов и катализаторов. - М.: Мир, 1973. - С.233-284.

108. Онищенко, Г.Г. Эпидемическая обстановка в Российской Федерации и основные направления деятельности по ее стабилизации / Г.Г. Онищенко // Матер. к докладу – Главного государственного санитарного врача Российской Федерации на VIII Всероссийском съезде эпидемиологов, микробиологов и паразитологов (Москва 26-28 марта 2002).- М.,2002.

109. Опыт производства комбикормов с хитозаном на Днепропетровском заводе рыбных кормов /Е.А. Гамызин, Т.И. Сазонова, Е.Д. Близнюк. И.В. Сушков // Новые перспективы в исследовании хитина и хитозана: Материалы V конференции.- М, 1999.-С.124-125.

110. Павлов, В.В. Химические перегруппировки в поверхностном слое дисперсных кремнеземов / В.В. Павлов, В.А. Тертых, А.А. Чуйко. – 1976. - №4. – С.62-69.

111. Пак, В.Н. Природа кислотных центров поверхности титансодержащих кремнеземов / В.Н. Пак, С.И. Кольцов, В.Б. Александровский // Теор. и эксперим. Химия. -1976.-№6.- С.839-843.

112. Парфит, Т, Адсорбция малых молекул / Т. Парфит, К. Рочестер – М.: Мир, 1986.–С.14–63.

113. Патент РФ №21652553. Способ лечения онкозаболеваний К.А. Трескунов, Б.А. Комаров. Приоритет от 20.01.98.

114. Патент РФ о заявке 97105499/25. Флокуляционный агент радионуклидов для дезактивации жидких радиоактивных отходов. //Бюл. 1998, №26.

115. Перспективы клинического применения иммуномодулирующих препаратов на основе хитозана / А.Д. Жоголев, К.Д.Жоголев, В.Ю.Никитин, В.Н.Цыган, // Медицинская иммунология.–2001. -3.–№2.–С.316–317.

116. Плаченков, Т.Г. Разработка конструкции поромеров для изучения структуры пористых тел методом вдавливания ртути. / Т.Г. Плаченков // Журн. прил. химии.–1965.–Т.28.–№3.–С.245–253.

117. Плиско, Е.А. Хитин и его химические превращения /Е.А.Плиско, Л.А.Нудьга, С.Н.Данилов //Успехи химии.–1977.–т. 46.–Вып.8.–С.1970–1987.

118. Покровский, В.И. Иммуноферментный анализ: современное состояние и тенденции развития / В.И. Покровский // Медицинская генетика и иммунология.- М.: 1986.- С. 4-5.

119. Поляченко, В.М. Обнаружение антигенов Francisella tularensis ИФА / В.М. Поляченко, С.П. Меринов, Е.П. Голубинский // ЖМЭИ. – 1983.–№11.–С.114–115.

120. Постнов, В.Н. Синтез неорганических матриц на основе силикагеля методом химической сборки / В.Н. Постнов // Сб. науч. тр. ЛГУ. - 1983.-С. 98-99.

121. Постнова, А.М. Исследование протонной кислотности титансодержащих силикагелей, полученных методом молекулярного наслаивания / А.М. Постнова, В.Н. Пак, С.И. Кольцов // Журн. физ. химии. -1981.-Т.35, №8.- С.2140-2141.

122. Практический курс химической и ферментативной кинетики: Учеб. пособие для химических специальностей ун-тов /И.В.Березин, А.А.Клесов.–М.: Из-во Моск.ун-та, 1976.–320с.

123. Препаративный метод выделения и очистки капсульного антигена чумного микроба при помощи изоэлектрической преципитации / М.М. Титенко, В.И. Вейнблат, М.С. Веренков, А.С. Васенин // Диагн. и профил. особо опасн. инфекций.-Саратов.- 1983.- С. 34-39.

124. Приказ №1179 от 10 октября 1983 г. Об утверждении нормативных затрат кормов для лабораторных животных в учреждениях здравоохранения.- Москва, 1983.

125. Пути совершенствования санитарно-эпидемиологической охраны территорий стран – участниц Содружества Независимых Государств // Проблемы сан-эпид. охраны территории стран Содружества Независимых Государств: Тез.докл. Междунар. науч.-практ. конф. (15-17 сентября,1998).- Саратов, 1998.- С. 3-6.

126. Рабинович, М.И. Применение хитозана фармакорректора содержания тяжелых металлов в организме животных на Южном Урале / М.И. Рабинович, А.Р. Таирова // Матералы V конференции «Новые перспективы в исследовании хитина и хитозана».- М, 1999.- С. 186-188.

127. Рогожин, С.В. Получение модифицированных кремнеземов для присоединения биологически активных соединений / С.В. Рогожин, В.Ю. Варламов, Д.Г. Вальковский // Изв. АН СССР / сер. хим. – 1975. - №8. – С.1718-1721.

128. Роуз, Э. Химическая микробиология / Э. Роуз. – М.: 1971.–С.45–60.

129. Рубин, А.Б. Биофизика 1. Теоретическая биофизика / А.Б. Рубин. – М.: Высш.школа, 1987.–319с.

130. Русин, Г.Г. Физико-химические методы анализа в агрохимии / Г.Г. Русин. – М.: Агропромиздат, 1990.–С.142–148.

131. Самойлова, Н.А. Хитозансодержащий гипополипидемический энтеросорбент /Н.А. Самойлова, В.Е. Рыженков, И.Я. Ямчков // Материалы V конференции «Новые перспективы в исследовании хитина и хитозана».-М, 1999.- С. 191-193.

132. Самошин, Н.М. Исследование свойств иммобилизационной кислой протеазы / Н.М. Самошин, Л.Т. Мотина, Л.И. Ерещенко // Прикл.биохим. и микробиология. – 1978, №4.- С.554-557.

133. Санитарные правила СП 1.2.2011.–94. Безопасность работы с микроорганизмами I–II групп патогенности Госкомсанэпиднадзор России. – М.: 1994.-С.74–78.

134. Сафронов, Т.М. Хитозан как флокулянт нативного рыбного белка /Т.М. Сафронов, Т.М. Бойцова .- М., 1999.- С. 251-252.

135. Свидетельство на полезную модель 8608 РФ, №98107798. Раневое покрытие «Хитоксин» /Б.А. Никонов, С.Ф. Антонов, А.И. Кобальтов и др. //Бюл.1998.-№12.

136. Сенюк, О.Ф. Использование хитинового препарата «Микотон» в качестве радиопротектора / О.Ф. Сенюк, Л.Ф. Горовой, И.А. Трутнева // Материалы V конференции «Новые перспективы в исследовании хитина и хитозана».- М, 1999.- С. 193-197.

137. Симонова, Л.В. Хитин и хитозан. / Л.В. Симонова, Л.К. Пашук // Косметика и медицина .- М,1998, №1. – С. 15-19.

138. Синицин, А.П. Зависимость стабильности иммобилизованной глюкоамилазы от способа иммобилизации / А.П. Синицин, А.И. Клибанов // Прикл. биохим. и микробиология.-1978.-№2.- С.236-242.

139. Синтез и магнитные свойства наночастиц окислов железа в матрице поливинилового спирта / А.В.Волков, М.А.Москвина, А.Л.Волынский и др. //Химия высокоорганизованных веществ и научные основы нанотехнологии: Автореф. Докл. // Междунар.конф./СПбГУ – СПб., 2001.–С.185–189.

140. Сорбенты на основе силикагеля в радиохимии / Б.Н.Ласкорин, В.В.Стрелко, Д.Н.Стражеско, В.Н.Денисов. -М.: Атомиздат, 1977.-304с.

141. Способ получения фракции – 1 чумного микроба и анализ эффективности отдельных этапов ее приготовления /Д.А. Будыка, А.И.Тинккер, Е.Л. Ракитина, Т.Н.Фунтикова, М.Н. Гончарова.- Ставрополь, 1988.- 13с.- Деп.о ВИНТИ 12.08.88. №6548-888.

142. Сравнительное изучение методов подготовки проб материала, содержащего бруцеллы, к проведению ПЦР–анализа /И.А Соколова, Г.И. Лямкаин, Я.Ф. Брюханов //Сборник науч. тр..- Саратов.- 2000.- Вып. 80. С. 148-151.

143. Стрелко, В.В. Классификация реакций с участием поверхности дисперсных кремнеземов и исследование процессов, замещения водорода, связанного с поверхностными атомами кремния / В.В. Стрелко, В.А. Каниболицкий // Коллоид. журн.-1971.-Т.33Ю, 5.- С. 750-756.

144. Сухоруков, А.М. Изучение сорбционных свойств полистироловых планшетов, используемых в иммуноферментном анализе / А.М. Сухоруков, А.М.Пономарева // ЖМЭИ.- 1987.- №9.- С. 18-22.

145. Терещенко, В.Г. Применение фитохитодеза в кардиологической реанимации /В.Г. Терещенко // Материалы научной конференции «Фитотерапия и лазеротерапия в XXI веке».- Черногловка, 1999.- С.86-88.

146. Тертых, В.А. Исследование взаимодействия  $\gamma$  - амиинопропил и  $\beta$  - цианэтилтриэтоксисиланов с поверхностью аэросилов методом ИК – спектроскопии / В.А. Тертых, А.А. Чуйко, И.Е. Неймарк // Теор. и эксперим. химия. – 1965. - №3. – С.400-405.

147. Тертых, В.А. Синтез и исследование поверхности аминорганокремнеземов / В.А. Тертых, А.А. Агзамходжаев, А.А. Чуйко // Изв. АН СССР сер. химия. – 1968. №8. – С.1739-1743.

148. Тертых, В.А. Основные закономерности взаимодействия силанольных групп кремнезема с алкилхлорсиланами ряда  $\text{Cl}_n\text{Si}(\text{CH}_3)_{4-n}(0-4)$  / В.А. Тертых, В.В. Павлов, К.И. Ткаченко // Теор. и эксперим. химия. – 1975. – Т.11, №2. – С.174-181.

149. Тертых, В.А.. О размещении структурных гидроксильных групп на поверхности аэросила / В.А. Тертых, В.В. Павлов, К.И. Ткаченко // Теор. и эксперим. химия.-1975.-Т.11, №3.- С.415-420.

150. Титенко, М.М. Получения капсульного антигена из культуральной жидкости изоэлектрической преципитацией // М.М. Титенко В.И. Вейнблат // Методическое пособие по биохимии, генетике и молекулярной биологии возбудителей чумы, и псевдотуберкулеза, Саратов.- 1985.- С. 8-9.

151. Тривен, М. Имобилизованные ферменты / М. Тривен. – М.: Мир, 1983.– с.23.



152. Тюменцева, И.С. Усовершенствование производственной схемы иммунизации животных моно- и поликомпонентными антигенами / И.С. Тюменцева, Е.В. Жданова, Е.Н. Афанасьев // Актуальные вопросы профилактики чумы и других инфекционных заболеваний: Матер.межгос.научн.практич.конф., посвящен. 100-летию открытия возбуд. чумы.–Ставрополь, 1994.–С. 237–238.

153. Тюменцева, И.С. Научно-методические основы конструирования и усовершенствования производства диагностических тест-систем для выявления возбудителей особо опасных и других инфекций // Автореф. Дис. ... д-ра мед. наук /И.С. Тюменцева .- Саратов,1996.- 57С.

154. Тюменцева, И.С. К вопросу диагностики возбудителя бруцеллеза / И.С. Тюменцева, Е.Н.Афанасьев, М.Н. Касторная // Эрдем шиншилл бутэлл.- Уланбатор,1999.- №7 .- С. 229-231.

155. Тюменцева, И.С. Синтез и исследования биосовместимых композиционных сорбентов для иммобилизации микроорганизмов / И.С. Тюменцева, Д.А. Грядских // Повестка дня на XXI век: программа действий –экологическая безопасность и устойчивое развитие: Мат.докл. Междунар.конф. - Ставрополь, 2002.- С.191.

156. Тюпенко, Г.И. Электрофорез сульфата хитозана для устранения дефектов слизистой полости рта /Г.И. Тюпенко, И.Н. Горбачева, Е.Е. Скорикова // Материалы VI Международной конференции «Новые перспективы в исследовании хитина и хитозана».- М, 2001.- С. 238-241.

157. Тюпенко, Г.М. Электрофорез хитозана при лечении заболеваний пародонта /Г.М.Тюпенко, Е.Е.Скорикова, А.Б.Зезин // Новые достижения в исследовании хитина и хитозана: Матер. В Международн.конференции.- Москва, 2001.–С.241–247.

158. Тютюрев, С.Л. Научные основы использования химических активаторов болезнеустойчивости в защите растений от патогенов // Дис. ... д-ра биол. наук / С.Л. Тютюрев.- Пушкин, 2000.-С.-Пб.-394с.

160. Умнова, Н.С. Приготовление иммунопероксидазных препаратов для диагностики особо опасных инфекций / Н.С. Умнова, И.П. Павлова, Г.В. Михеева // Актуальные вопросы иммунодиагностики особо опасных инфекций: Тез. Докл. Всесоюзной конф.– Ставрополь, 1986.–4.2.–С.95–98.

161. Фрайфельдер, Я. Физическая химия. /Я.Фрайфельдер.–М.: Мир, 1980. – 418 с.

162. Характеристика препаратов капсульного антигена, выделенных из бульонной культуры штамма *Y. pestis EV* / В.И. Вейнблат, М.М. Титенко, М.С. Веренков и др., // ЖМЭИ.- 1985.- №4,- С. 19-24.

163. Хитозан *regos* от пищевой добавки – к лекарственному средству / Под ред. Р. Муцарелли.- Нижний Новгород: Олигофарм, 2001.- 370с.

164. Хлебников, В.С. Диагностические препараты на основе моноклональных антител для иммуноферментативных тест-систем и люминесцентно-серологического метода определения туляремийного микроба / В.С. Хлебников, Г.В. Гречко, С.С. Ветчинин // Состояние проблемы и перспективы развития диагностики бактериальных инфекций: Мат.раб.соавторов. – Оболенск, 1990.–С. 66–67.

165. Ходж, Ф. Органические реакции с использованием реагентов или субстратов, ковалентно закрепленных на функционализированных неорганических носителях / Ф. Ходж // Журн. Всес. об-ва им. Д.И.Менделеева. - 1989.- Т.34, №3.-С.33 1-339.

166. Чувствительность и специфичность твердофазного иммуноферментного метода с использованием моноклональных антител для обнаружения фракции 1 чумного микроба / О.Н. Лопаткин, Н.Т. Лазарева, Л.И. Калмыкова, О.В. Малецкая // НИПЧИ, Ставрополь, 1985.–Деп.в ВИНТИ. 19.08.85. –№4385.

167. Чуйко, А.А. Аминокремнеземы как химически активные сорбенты и наполнители полимерных материалов / А.А. Чуйко, В.А. Тертых, Г.Е. Павлик // Коллоид. журн. – 1965. – Т.27, №6. – С.903-907.

168. Шаханина, К.Л. Выбор критериев пригодности твердофазных носителей на основе полистирола для проведения иммуноферментного анализа / К.Л. Шаханина, А.А. Соколенко, И.П. Павлова // ЖМЭИ.- №9.- 1987.-С. 8-11.

169. Эпидемиологическая обстановка по чуме в мире, СНГ и России: состояние, тенденции, прогноз / Г.Г. Онищенко, А.М. Кокушкин, О.И. Кедрова и др. // Проблемы сан-эпид. охраны территории стран Содружества Независимых Государств: Тез.докл. Междунар. науч.-практ. конф. (15-17 сентября,1998).- Саратов, 1998.- С. 54-56.

170. Янишпольский, В.В. Иммобилизация ферментов на активированных аминокремнеземах / В.В. Янишпольский, В.А. Тертых, А.А. Чуйко // Тез. 12 Укр. конф. по физ. химии.-Киев, 1977.- С.203.

171. Anaokar, S. Solid-phase enzyme immunoassay for serum ferritin / S. Anaokar, P.J. Sorry, J.C. Standefer // Clin. Chem.-1979.- V.25.-P.1426-1431.

172. Aphanasev, E.N. The problems of brucellosis /E.N.Aphanasev, I.S. Tyumenzeva, M.N. Kastornaya // ЭРДЭМ Шинжилгээний БҮТЭЭЛ, 1999.- №7. - РЮ229Ю.

173. Austin , P.R. Chitin: New Facts of Research / P.R. Austin, C.I.Brine, I.E. Castle, I.P.Zikakis // Science.-1981.-212.- P. 719.

174. Bascom, W.D. Hydrolysis of triethylethoxysilans at the silica carbon tetrachloride interface / W.D. Bascom, R.V. Timols // I. Phus. chem.. – 1972.- V.76.- P.320

175. Boorsma D.M., Strefkert J.G. Peroxides on qlutaraldehyde for prospering peroxides conjugates / D. M. Boorma, J. G. Strefkert // J. immuonol. Methods.- 1979.- №30.- P. 245-255.

176. Brine, C.G. Utilization of chitin a cellulose derivative from crab and shrimp waste / C.G. Brine, P.R. Austin // Delaware university project Report,1974.-№19.- P. 12.

177. Burwell R.L. Modified silica gels adsorbents and cater list //Chem. Techkol.-1974.-V.15, №1.-P.370-377.

178. Carlsson, E. Enzyme linked immunosorbent assay for immunological diagnosis of human tularemia / E. Carlsson, A. Lindberg // J. Clin. Microbiol. – 1979.- v.10, №5.- P. 615-621.

179. Cavanaugh, D.C. Fortier M.K., Robinson D.M. Application of the ELISA technique to problem in the serologic diagnosis plaque / D.C. Cavanaugh, M.K. Fortier, D.M. Robinson // Bull. Penam. Health. Org., 1979.-v.13, №4.- P. 399-402.

180.Chomel, B.V. Chanqibq trends in the epidemiology of human brucellosis in California from 1973 to 1992: a shift toward food borne transmission B.V. Chomel, E.E. De Bess, D.M Mabqiameie // J.Infect. Dis.-1994. – V.170 (5).-P.1216-1223.

181. Clark M.F. Characteristics of the micro plate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant virus / M. F. Clark, A.N. Adams //J.Qen. Virol. – 1977/-V.36, №3.- P.475-483.

182. Comparison of an enzyme - linked immunosorben assay ELISA with a radioimmunoassay (RIA) for the measurement of ratiusulin

/ H. Webster, L. Bone Adrian, A. Katherine Webster, J. Terence Wilkin // J. Immunol. Method.- 1990.-v.134, 1.- P.25-100.

183. Dion, Le Doan. Research on Using Chitosan for Storage of Oranges in Vietnam / Le Doan Dien, Tran Quang Binh // Second Asia Pacific Chitin Symposium.- Bangkok, 1996.- P. 200-203.

184. Domard, A. Some Physicochemical and Structure Basis for Applicability of chitin and chitosan / A. Domard // Second Asia Pacific chitin Symposium.- Bangkok, 1966.- P. 1-12.

185. Ernst, E. Chitosan as treatment for body weight reduction. A meta-analysis / E. Ernst, M.H. Pittler // Perfusion.- 1998, №11.- 3.- P. 461-465.

186. Felit, O. Chitosan: A unique Polysaccharide for Drug Delivery / O. Felit, P. Buri, R. Gumy // Drug Development and Industrial pharmacy.- 1998, №24.-P. 979-993.

187. Filar, Y. Bulk and Solution Properties of chitin Specific enzyme-linked immunosorbent / Y. Filar, M.C. Winick, A. Freeman // I. Biotechnol. Biunq.- 1981, V.23.- P.31-33.

188. Hertl, W. Mechanism of Gaseous Silo sane Reaction willies / W. Hertl // I. Rhus. Chem. – 1968. – V. 72. – P. 3993-3997.

189. Jirgensons, B. Organic Coloids / B. Jirgensons.- Austin: University of Texas. Princeton: Elsevier publishing company, 1958, 422 p.

190. Kato K., Hamguchi Y., Fukui H. Enzyme - linked immunoassay, 1. Novel method for synthesis of the insulin-D-glycosidase conjugate and its applicability for insulin assay // J. Biochem.-1975.-V.78.- P.235-237.

191. Konig H.J., VOB H. Verfahren zur Herstellung von mechanisch stabilen enzymhaltigen Immobilisation. Pat. 282923. GDR, MKU 540.-P.12.-N 11/04 /Tschistowkaya/. Martin – Luther-Universität Halle – Wittenberg. – N3281731. – 1990.

192. Kumar, G. Enzymatic Grafting of a Natural Product to chitosan to confer water solubility under basic conditions / G. Kumar, P. Smith, G.F. Payne//Biotechnology and Bioengineering, 1999.- v.63, №2.- P. 154-164.

193. Lim, L.Y. Effects of dry heat and saturated steam on the phased properties chitosan / L.Y. Lim, Khor, C.E. Ling // Journal Biomedical Materials Research, 1999.- v. 48. №2.- P. 111-116.

194. Methods in enzymology / P.Z. Masson, C.Z. Cambiaso, D. Collet-Cassat, C.G. Magmisson et al //Academic Press Inc. New-York., USA.-1981.-V.74.-P.106-139.

195. Mayer, S.P. Chitosan as Prolog in the waste water treatment / S.P. Mayer // Agriculture, Food, Chemistry.- 1989, №5.

196. Monson, P. Optimization of glutaraldehyde activation of a support for enzyme immobilization / P. Monson // I.Mol. Catal. – 1978.- V.3, №5.-P.371-384.

197. Naitu, J. Industrial applications of immobilized microbial cells / J. Naitu // World Biotech. Rept., Proc. Conf.-London, New –York, 1987.-v.1, Pt.3.-P.93-101.

198. Nakane, P.K. Peroxidase-labelled antibody – a new method of conjugation /P.K. Nakane, A. Kawaoi // J.Histochem. Cytochem.-1974.- V.22. №4-P.506-506.

199. Ouchterlony, O. Antigen-antibody reactions in gel./ O. Ouchterlony // Aktiv. For. Kemi. Mineral o Geol.- 1949.-v.261.-№14.- P.1-9.

200. Oqawa K. X-Ray diffraction study of sulfuric, nitric and halogen and salts of chitosan /K.Oqawa, 8. Ibukai // Carbohydr. Res.- 1987.-V.160.- P. 425-433.

201. Patent 4241176 (USA)-23/12. Avrameas S.M., Gutsdon J.L. Magnetic del suitable to immunoenzimatic determination / S.M Avrameas., J.L Gutsdon //In.CL. C 1201/66, CO7 G7/00 – 1980

202. Patent E.P. №460774. Manufacture of wound dressings from microfungual fibers / B. Sagan, P. Mamlyn, D. Wales.-1991.

203. Polson, A. The fractionation of protein mixtures hay linear polymers of bight molecular weight /A. Polson, O.M. Potgieter, I.E. Largarier //Biochem. Biopsies. Acta.-1984.-V.82.

204. Qold, P. Demonstration of tumor-specific antigens in human colonic carcinoma by immunological / P. Qold, S.O. Freedmmam // I.Exp.Ved.-1965.V.121.- P.439.

205. Rees D.A., Morris E.A. In: The Polysaccharides. / D.A. Rees, E.A. Morris Academies Press, New- York and London, 1982.-v.1.-221p.

206. Robinson, P.I. Porous glass a solid support for immobilization of finite chromatography of inhumes, Biochim, et biochips / P.I. Robinson, P. Dunmill, M.D. Lillu // Acta. – 1971. – V. 242. – P.659-661.

207. Soto-Peralta, N.V. Effects of Treatments on the clarity and colon of Apple Juice / N.V. Soto-Peralta // Journal of Food Science, 1989.- v. 54, №2.- 3.- P. 495-496.

208. Stahe, S.P. Diagnosis of human brucellosis with ELISA / S.P. Stahe, A. Marmonior, M.I. Micoud //Lancet.-1982.V.11, N8299.-P.669.

209. Stavitsky,A.B. Haemagglutination and haemagglutination inhibition reactions with tannic acid – and vis-diazotired benzidin-hroteiconjugated erythrocytes // IN: Immunological methods.- ED.Acrord J.F.- Oxford.- 1964.

210. Sting R., Ortman G. Erfahrungen mitt einfachen ELISA – Test-systemes fur die Brucellose – Serologie bei Rind, Schaf und Ziege //Berlin. Und munch. Wochenschr.-2000.-Vol.113.-N1.P.22-28.

211. Studies on immunization against plague. The isolation and characterization of the Soluble antigen of Pasteur Ella pestis / E.E.Baker, Y. Sommer, L.E. Foster., et al //I.Immunl.- 1952.- v.68, №2.- P. 131-145.

212. Tabatabai, L.B. Specific enzyme-linked immunosorbent assay for detection of bovine antibody to Brucella abortus / L.B.Tabatabai, B.L. Deyoe //J.Clin. Microbiol.-1984.-V.20, №2.-P.209-213.

213. Wand H.Y. Hettwer D.I. Methods in enzymoloqu. / H.Y. Wand, D.I.Hettwer //Biotechnol. Bioenq,1982.- V.24.—P.45-48.

214. Warburg, O. Isolierung and Krystallization des Garugsterments Enlase / O. Warburg, W.I. Christian // Biochem. J. – 1941.- v.310.- P. 1120-1122.

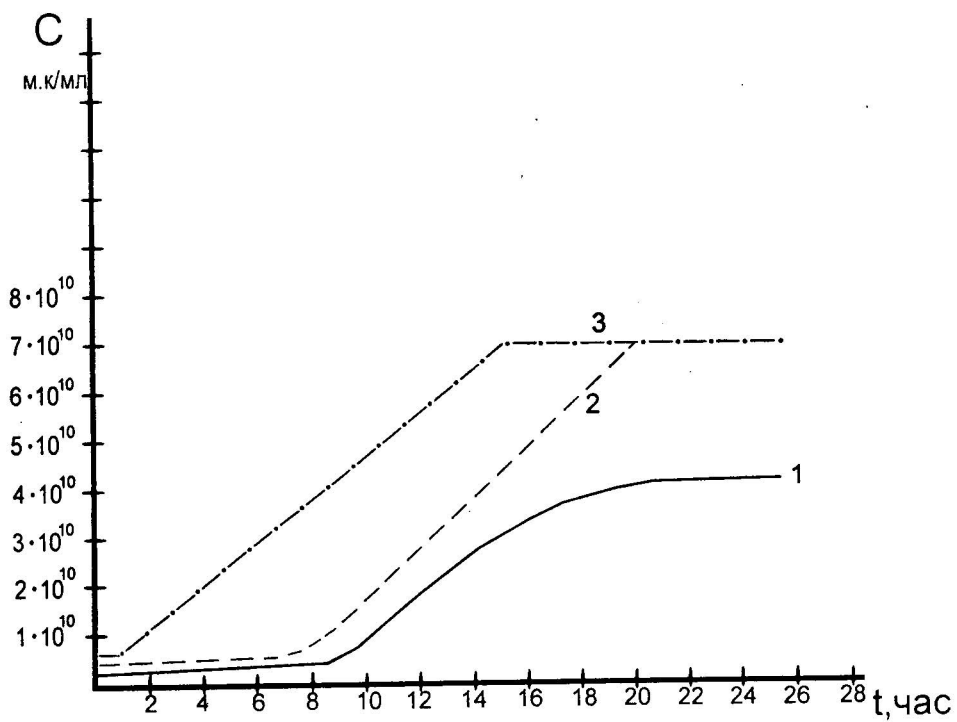
215. Weller, T.H. Fluorescent antibody studies with agents of varicella and herpes zoster propagated in vitro / T.H. Weller, A.H. Coons // Proc. Soc. Exp. Biol.-1954.-. v.86. – P. 789-794.

216. Werblin, T.P. Studies on the control of antibody synthesis III. Changes is heterogeneity of antibody affinity during the congress of the immune response / T.P. Werblin, Tai Kim Young, G.W. Siskind //I.Immunoboqy.–1973.-v.24.-P.477.

217. Yackman, R. Light-scattering and infrared spectrophotometric studies of chitin and chitin derivatives / R. Yackman, M. Goldberg // Carbohyd. Res.-№38.-1974.-P. 35-45.

218. Yamamoto A. Conformational behavior of chitosan in the acetate salt: A varies study /A.Yomamoto. I.Kawada, T. Yui K. Oqawa // Biopsies. Biotech. Biochem.–1997. V.61.-P.1230-1232.





**Рисунок 2. Кривые роста популяции *Y.pestis EV* при глубинном культивировании**

1. Выращивание без МИС – инокулята (контроль)
2. Первичное выращивание с МИС-инокулятом
3. Повторное выращивание с МИС-инокулятом