

ИЗУЧЕНИЕ ЛЕКАРСТВЕННОГО ПРЕПАРАТА, СОДЕРЖАЩЕГО ЭКСТРАКТ ГИНГКО БИЛОБА, МЕТОДОМ НЕКЛАСИЧЕСКОЙ АФФИННОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

ной хроматографии [6] (вариант ЖКХ) для изучения флавоноидной фракции препарата Танакан. Данная стратегия при получении азо-ААФТ, где в качестве лиганда-модификатора использована суммарная флавоноидная фракция исследуемого объекта, впервые описана в работе [9].

В данной работе так же впервые показан уникальный эффект разделения и накопления (обильный остаток в процессе высушивания) при применении элюента Кузнецова - Халахина.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Jaggy H. Koch E. // Pharmazie.— 1997.— V.52, № 10.— P. 735–738.
2. B. Duff, Sloley S.R., Tawfik K.A., Scherban Y.K. Tam J. // Food and Drug Anal. 2.- Vol.11.- 2003.- P.102-107.
3. Зузук, Б. М., Куцук, Р. В., Томчук, Ю. Ю., Дармограй, Р. Е. // Провизор.-2001.-№19.- С.15-22.
4. Халахин В.В., Кузнецов П.В. // Сборник тезисов докладов. Химия XXI – век: новые технологии, новые продукты.- Кемерово, 2007.- С.160-161.
5. Халахин В.В., Кузнецов П.В. // Сборник научных трудов пятигорской фармацевтической академии том №63 Разработка, исследование и маркетинг новой фармацевтической продукции.- Пятигорск.- 2008. – С. 353-355.
6. Кузнецов П. В. Эпоксидированные адсорбенты аффинного типа в исследовании физиологически активных веществ. Кемерово. Кузбассвуиздат.- 2002.- 104 с.
7. Халахин В.В., Дудин А.А., Кузнецов П.В. // Ползуновский вестник. 2008.- № 3.- С.190-193.
8. Шаршунова М. Шварц В. Михалец Ч. Тонкослойная хроматография в фармации и клинической биохимии. Мир.- М.- 1980.- Том 2 .- 621с.
Сухих А.С., Коршунов А.В., Кузнецов П.В. // Сборник научных трудов пятигорской фармацевтической академии том №63 Разработка, исследование и маркетинг новой фармацевтической продукции.- Пятигорск.- 2008. – С. 339-341.

РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ ИММОБИЛИЗАЦИИ КУЛЬТУРЫ РАСТИТЕЛЬНЫХ КЛЕТОК И ТКАНЕЙ НА ЦЕЛЛЮЛОЗОСОДЕРЖАЩИХ НАНОСТРУКТУРИРОВАННЫХ НОСИТЕЛЯХ IN VITRO

А.С. Косолапова, М.Э. Ламберова

Разработаны новые подходы к интенсификации традиционных трудоемких способов культивирования клеток и тканей in vitro.

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время является актуальной разработка новых подходов к интенсификации традиционных трудоемких способов культивирования клеток и тканей in vitro.

Современный метод культуры клеток и тканей позволяет получить чистую клеточную биомассу лекарственных растений или размножить оздоровленный безвирусный посадочный материал сельскохозяйственных растений в сравнительно короткий срок на ограниченных площадях. Все стадии этого процесса требуют строгого соблюдения правил асептики.

К известным проблемам относятся трудоемкость метода, большой расход компонентов

питательной среды, относительно невысокая эффективность стерилизации эксплантов.

Агар – традиционный носитель культуры клеток и тканей in vitro, является дефицитным и дорогостоящим. Полисахарид агар образует прочный студень, обладающий стекловидным изломом без добавки кислоты и сахара, его желирующая способность в 10 раз больше, чем у желатина. Попытка замены его на белок желатин показала, что растительные клетки не очень плохо растут, несмотря на приемлемую температуру его плавления. Короткие сроки культивирования клеток и тканей in vitro и необходимость дополнительной стерилизации посадочного материала значительно усложняют данный процесс.

В данной работе для замены агара как носителя обрабатывалась технология иммобилизации клеточных культур на наноструктурированном носителе целоформе и микрокристаллической целлюлозе. Определены основные показатели процесса культивирования иммобилизованных клеток и тканей *in vitro* сельскохозяйственных растений гречихи, сои и картофеля.

Микрокристаллическая целлюлоза представляет собой высокополимерный углевод, состоящий из остатков глюкозы $C_6H_{10}O_5$ с β -1,4-гликозидной связью.

Первоначальная длина цепи зависит от происхождения целлюлозы. Она максимальна в природном состоянии и уменьшается в процессе выделения, очистки и преобразования в производные соединения (таблица 1).

Таблица 1
Степень полимеризации целлюлозы [1]

Материал	Число гликозидных остатков
Необработанный хлопок	2500–3000
Очищенный хлопковый линт	900–1000
Очищенная древесная масса	800–1000
Регенерированная целлюлоза	200–400
Промышленный ацетат целлюлозы	150–270

Увеличение доли кристаллитной фазы с учетом фрагментирования макромолекул целлюлозы существенно увеличивает свободную поверхность фибрилл и разрыхляет их структуру. В результате происходит увеличение сорбционной емкости хлопкового волокна по отношению к воде и другим жидким субстратам, то есть дополнительному поглощению влаги и растворению в биологических жидкостях под воздействием естественной микрофлоры. Активированный порошок хлопковой целлюлозы представляет собой полупрозрачные иглы (20-50 мкм) с очень острыми косо срезанными краями. Такая структура обеспечивает хорошее сцепление с мембранными поверхностями клеток как микроорганизмов, так и тканей человека, способность удерживать не только воду, но и элементы крови и лимфы [1].

Из литературы известно, что бактерицидными свойствами обладает целоформ – целлюлозосодержащий носитель с наноразмерами частиц и пор, полученный из линта –

отхода при переработке хлопка в производстве медицинской марли [2].

Целоформ – это белый порошок из хлопковой целлюлозы с длиной волокон 20-50 мкм. При нанесении в рану целоформ образует «активную хирургическую повязку», через которую не проникают микроорганизмы. Для уже существующих бактерий создаются неблагоприятные условия из-за гидрофильных свойств целоформа. При этом сохраняется газообмен и питание поврежденных тканей, создаются благоприятные условия для нейтрофилов и макрофагов, уничтожающих микробов. Обладает длительным адсорбирующим, противомикробным действием, не вызывает побочных реакций в виде раздражений и непереносимости, имеет хорошие дезодорирующие свойства [2].

Увеличение доли кристаллитной фазы с учетом фрагментирования макромолекул целлюлозы существенно увеличивает свободную поверхность фибрилл и разрыхляет их структуру. Результатом такого воздействия безусловно должно быть увеличение сорбционной емкости хлопкового волокна по отношению к воде и другим жидким субстратам. Увеличение же поверхности и фрагментирование макромолекул должно существенно увеличить способность хлопковой целлюлозы к набуханию (дополнительному поглощению влаги) и растворению в биологических жидкостях под воздействием естественной микрофлоры.

Структура измельченных волокон хлопковой целлюлозы существенно отличается от структуры волокон хлопковой ваты. В частности, образующийся активированный порошок с размером частиц 20-50 мкм, представляет собой полупрозрачные иглы с очень острыми косо срезанными краями. Такие иглы должны иметь хорошее сцепление с мембранными поверхностями клеток, как микроорганизмов, так и тканей человека, легко удерживать не только воду, но и элементы крови и лимфы. Это является абсолютно новым свойством по сравнению не только с хлопковой ватой, но и любыми другими медицинскими сорбентами, которые обычно имеют структуру сферолитов.

На рисунке 2 приведены микрофотографии фрагментированных волокон хлопковой целлюлозы, подвергнутых компрессионно-сдвиговому воздействию при механохимическом активировании. Из этих фотографий хорошо видна иглообразная структура частиц.

РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ ИММОБИЛИЗАЦИИ КУЛЬТУРЫ РАСТИТЕЛЬНЫХ КЛЕТОК И ТКАНЕЙ НА ЦЕЛЛЮЛОЗОСОДЕРЖАЩИХ НАНОСТРУКТУРИРОВАННЫХ НОСИТЕЛЯХ *IN VITRO*

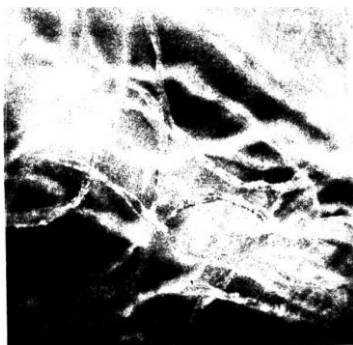


Рисунок 1. Исходный образец хирургической хлопковой ваты (масштаб: 1 мм. = 2 мкм)



Рисунок 2. Эталонный образец, полученный механохимическим активированием в лабораторных условиях в КГТУ (г. Казань) (масштаб: 1 мм = 2 мкм)

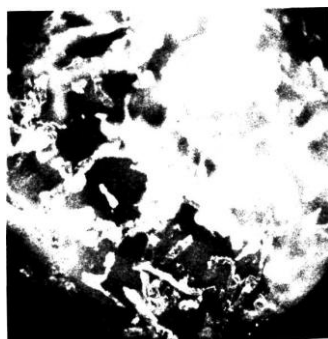


Рисунок 3. Промышленный образец, полученный из хлопковой ваты в КГТУ (г.Казань) (масштаб: 1 мм = 2 мкм)

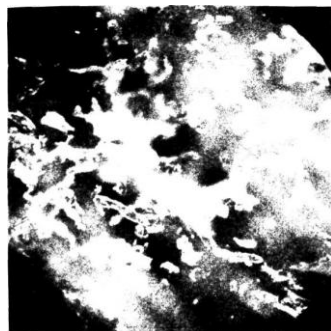


Рисунок 4. Промышленный образец, полученный из отходов производства бинтов в КГТУ (г.Казань) (масштаб 1 мм = 2 мкм)

Из приведенных на рисунках 1-4 данных видно, что механохимическое активирование хлопковой целлюлозы за счет компрессионно-сдвигового воздействия, является хорошо воспроизводимым процессом и может применяться для различных видов сырья, в том числе и отходов медицинской промышленности.

Исходная вата состоит из однородных волокон диаметром 2-4 мкм и длиной волокон порядка 20-50 мм, которые имеют гладкую поверхность и относительно невелика, что не позволяет получить большую сорбционную емкость по отношению к воде и биологическим жидкостям (рисунок 1).

После механохимического активирования удельная поверхность увеличивается по крайней мере на порядок за счет уменьшения дисперсности системы, так как размер волокон уменьшается на три порядка до 20-50 мкм (рисунки 2-4).

В технологии культуры клеток и тканей *in vitro* важными проблемами являются стадии стерилизации эксплантов, вводимых в культуру, стимуляция роста клеток и их биосинтетическая активность. Часто стерилизация проводится химическими веществами, но они могут накапливаться в клетках и ингибировать их рост.

При промышленном производстве посадочного материала одной из главных проблем является дорогостоящий агар, и короткий срок между посадками на агаризованную питательную среду.

В процессе культивирования иммобилизованных клеток определены эффективности стерилизации, каллусообразования и прироста биомассы.

В данной работе в процессе разработки технологии иммобилизации клеток и тканей *in vitro* была отработана методика нанесения клеток и тканей *in vitro* сельскохозяйственных растений гречихи, сои и картофеля на целлоформ и микрокристаллическую целлюлозу и способ культивирования на них.

Для приготовления эксплантов, вводимых в культуру клеток и тканей *in vitro* брали проростки семян, гипокотиль корня, зародышевые листья, части листьев, апикальные меристемы, пазушные меристемы гречихи, сои и картофеля. Подготовленные экспланты стерилизовали химическим путем и ультразвуком. Иммобилизацию клеток *in vitro* производили на носителях: агар, МКЦ, целлоформ.

Оценивали эффективность стерилизации. Затем культивирование клеток производили при $t = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$ и влажности 70,0 %, в тем-

ноте. На стадии культивирования и инициации каллусообразования оценивали эффективность каллусообразования.

На рисунке 5 представлен график зависимости эффективности стерилизации от длительности культивирования на агаризованной среде и способа обработки эксплантов. Эффективность стерилизации оценивали по количеству неинфицированных эксплантов в пробирках после стерилизации, выраженная в процентах, от исходного количества стерилизуемых эксплантов.

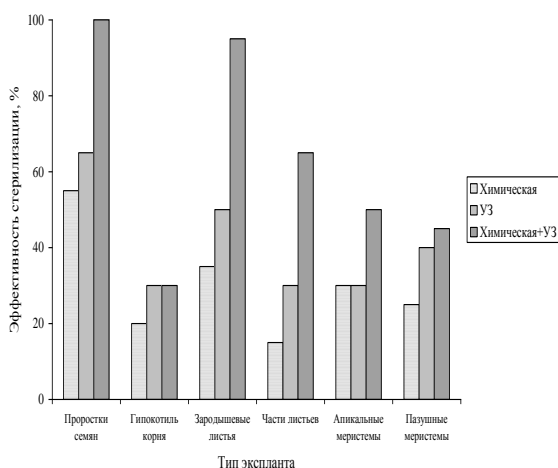


Рисунок 5. Сравнительная диаграмма зависимости эффективности стерилизации от способа обработки различных эксплантов

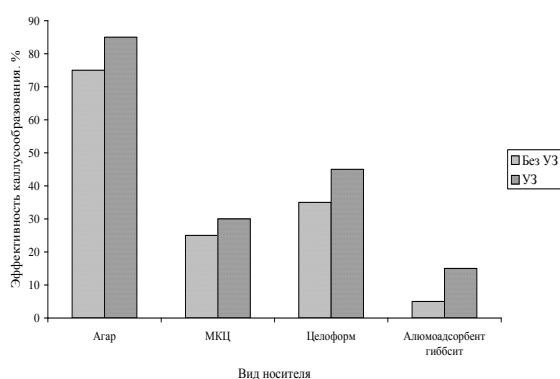


Рисунок 6. Сравнительная диаграмма зависимости эффективности каллусообразования клеток, иммобилизованных на различных носителях

При замене агара на другие носители, кроме целоформа и МКЦ для сравнения применяли также алюмоадсорбент гиббсит. Ре-

зультаты каллусообразования на них показаны на рисунке 6.

Сравнивали эффективность каллусообразования клеток, иммобилизованных на носителях без УЗ, и при обработке УЗ. При выбранных режимах УЗ-обработки мощностью 240 Вт и длительностью 3 минуты, эффективность каллусообразования больше на всех видах носителей, чем на носителях без УЗ-обработки.

Из адсорбционных, неагаризованных носителей наилучший эффект каллусообразования наблюдался на целоформе, при обработке ультразвуком оптимальными режимами воздействия.

По результатам данной работы можно сделать следующие выводы:

- изучено влияние методов обработки эксплантов на эффективность стерилизации. Наилучший эффект стерилизации был получен при совместной обработке химической и УЗ, который составил – 95,0...100,0 %, что на 53,0 % больше чем при химической обработке, и на 25,0 % - чем при УЗ-обработке;

- изучено влияние типа экспланта на каллусогенез. Оптимальными являются экспланты в виде проростков семян и зародышевых листьев, при этом эффективность каллусообразования составляет 60,0 % и 70,0 % соответственно;

- отработана методика иммобилизации и культивирования клеток гречихи *in vitro* на различных носителях. Наилучшим носителем для иммобилизации клеток гречихи является целоформ;

- исследовано влияние ультразвука на эффективность каллусообразования клеток гречихи, иммобилизованных на различных носителях, при замене синтетических фитогормонов на натуральные. При обработке ультразвуком эффективность каллусообразования на всех видах носителей больше, чем на носителях, необработанных УЗ на 12,0 %.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бутенко, Р. Г. Биотехнология растений: культура клеток и тканей - М.: Высшая школа. Агропромиздат, 1989. - 279 с.
2. Калинина Ф.Л. Методы культуры тканей в физиологии и биохимии растений – Киев: Наукова думка, 1980. – 488 с.
3. Катаева Н. В. Клональное микроразмножение растений. - М.: Наука, 1983. - 96 с.