

# **Акт исследований антитоксической активности и сорбционной емкости препарата «Рекицен - РД».**

*НАУЧНО – ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ МИКРОБИОЛОГИИ  
МИНИСТЕРСТВА ОБОРОНЫ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ*

25 января 1995 года, г. Киров, обл.

В соответствии с «Программой структурной перестройки экономики и внешних связей Кировской области», подпрограммой «Биотехнология», проектом «Биокорма», подпроектом «Рекицен - РД» в период с 01.09.94г. по 25.01.95г. на базе отдела токсикологии НИИ микробиологии МО РФ комиссия в составе: начальника отдела токсикологии, кандидата биологических наук Рудого Б.А. (председатель); старшего научного сотрудника, кандидата медицинских наук Юрченко А.В. (зам. председателя) и членов комиссии: научного сотрудника, кандидата медицинских наук Луба М.Ю.; младшего научного сотрудника Федотова А.К. и лаборанта-исследователя Повышевой Т.П. провела анализ антитоксической (токсиннейтрализующей) активности и сорбционной емкости препарата Рекицен - РД, полученного из ТОО «ЭкоБиоТехноЦентр» (г. Москва).

Испытаниям были подвергнуты три серии препарата Рекицен - РД, с условными обозначениями С-1, С-2, С-3.

Для определения антитоксической активности использовали специально приготовленные опаспортизованные препараты следующих токсинов:

ботулинического токсина типа А с удельной активностью  $2 \times 10^7$  ЛД<sub>50</sub>/мг белка, рабочее разведение 100ЛД<sub>50</sub>/мл; шигеллезного токсина удельной активностью  $1,3 \times 10^4$  ЛД<sub>50</sub>/мл, рабочее разведение 1000ЛД<sub>50</sub>/мл;

термолабильного энтеротоксина кишечной палочки (по механизму действия аналогичный холерному токсину) с удельной активностью  $1,8 \times 10^3$  ЕД<sub>50</sub>/мг белка, рабочее разведение 1000 ЕД<sub>50</sub>/мл. Определение величин ЛД<sub>50</sub> для ботулинического и шигеллезного токсинов проводили в опытах на белых мышах при внутрибрюшинном заражении с шагом разведения равным 2. Для термолабильного энтеротоксина кишечной палочки величину ЕД<sub>50</sub> определяли на белых мышах в тесте отека задней конечности (шаг разведения равен 5). Расчет величин ЛД<sub>50</sub> и ЕД<sub>50</sub> соответствующих токсинов осуществляли по методу Кербера в модификации Ашмарина. Рабочие разведения препаратов токсинов готовили непосредственно перед проведением исследований. Для определения сорбционной емкости Рекицена - РД использовали краситель конго-рот (квалификации «Ч»), предварительно экспериментально подобрав его концентрацию.

## **ОПРЕДЕЛЕНИЕ АНТИТОКСИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ РЕКИЦЕНА - РД**

Навеску  $(1,0 \pm 0,001)$ г. Рекицена - РД вносили в пробирку с 10мл рабочего разведения соответствующего токсина и тщательно перемешивали. В контрольную пробу вместо Рекицена - РД добавляли  $(1,0 \pm 0,1)$  мл физиологического раствора. Пробу инкубировали в водяном ультратермостате в течение 1 часа при температуре  $(37,0 \pm 0,1)$ град.С. Затем производили центрифугирование проб на рефрижераторной центрифуге при 5000 об/мин. и температуре  $(10 \pm 1)$  град.С в течение 30 мин. Надосадочную жидкость отбирали и определяли титр токсинов в опытной и контрольной пробах в экспериментах на белых мышах. Пробу, содержащую ботулинический и шигеллезный токсины, разводили с шагом равным 2 физиологическим раствором и вводили внутрибрюшинно белым мышам в объеме 0,5мл. За животными наблюдали в течение 7 суток, регистрируя их гибель. При использовании термолабильного энтеротоксина кишечной палочки пробы разводили с шагом равным 5 и вводили животным в подошвенную поверхность одной задней конечности в объеме 0,05мл. В противоположную конечность вводили такое же количество физиологического раствора (контроль). Через 48 часов животных умерщвляли эфиром и производили ампутацию опытной и контрольной лапок по коленному суставу. Ампутированные конечности взвешивали на торсионных весах с точностью до 1мг. Разница веса опытной и контрольной лапок более 65мг свидетельствует о наличии в пробе термолабильного энтеротоксина.

Вся работа проводилась в асептических условиях. По результатам титрования на животных рассчитывали показатели относительной (по сравнению с контролем) токсичности опытной пробы по следующей формуле:

Co

OT= ----- x100%, где

Ск

OT – относительная токсичность;

Co – концентрация (титр) токсина в опытной пробе;

Ск – концентрация (титр) токсина в контрольной пробе.

Результаты исследований представлены в табл.1.

Таким образом, в условиях проведения анализа 1г. Рекицена-РД нейтрализовал около 900 мышинных ЛД<sub>50</sub> ботулинического токсина типа А, 9000 ЛД<sub>50</sub> шигеллезного токсина и 8600 ЕД<sub>50</sub> термолабильного токсина кишечной палочки.

Таблица 1.

### Результаты анализа токсинсодержащих проб после их обработки препаратом

Исследуемый препарат	Показатели антитоксической активности Рекицена-РД в отношении токсинов					
	ботулинического		шигеллезного		термолабильного энтеротоксина	
	1) OT, % $\bar{M} \pm m$	2) Ки $\bar{M} \pm m$	OT, % $\bar{M} \pm m$	Ки $\bar{M} \pm m$	OT%, $\bar{M} \pm m$	Ки $\bar{M} \pm m$
Рекицен-РД С-1	13,2±1,6	7,6±0,8	11,3±1,9	8,8±1,8	14,1±2,7	7,1±1
Рекицен-РД С-2	12,8±2,4	7,8±1,9	12,0±2,0	8,3±1,7	13,8±2,8	7,2±1
Рекицен-РД С-3	13,4±2,3	7,5±1,4	11,6±1,7	8,6±1,2	14,6±3,1	6,8±1
Контроль	98,6±8,9	1,01±0,11	108,4±10,7	0,9±0,2	92,7±9,6	1,1±0

Примечания: 1. Средние значения величин рассчитаны по результатам трех экспериментов с вероятностью в 95%.

2. Ки – коэффициент инактивации токсина (1/OT).

### ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОРБЦИОННОЙ ЕМКОСТИ РЕКИЦЕНА - РД

Сорбционную емкость Рекицена - РД исследовали в отношении красителя конго-рот. Концентрацию красителя определяли фотометрическим способом на спектрофотометре СФ-26. Для этого предварительно строили калибровочный график зависимости экстинкции от концентрации красителя в диапазоне от 10 мкг/мл до 136 мкг/мл.

Предварительно экспериментально подбирали рабочую концентрацию красителя, при которой получались наиболее информативные и воспроизводимые результаты. Она составила 90 мкг/мл.

Навеску (1,0±0,001)г Рекицена-РД смешивали с 10мл рабочего разведения красителя. Выдерживали в ультратермостате в течение 1 часа при температуре (37,0±0,1)град.С, периодически перемешивая. Затем пробы центрифугировали при 6000об/мин в течение 30 минут. Надосадочную жидкость переливали в другие пробирки и определяли в ней концентрацию красителя на спектрофотометре. По разнице концентрации красителя в контрольной и опытной пробах определяли коэффициент сорбции (Кс), который измеряли в единицах поглощения (ЕП). Одна ЕП соответствует одному мкг сорбированного красителя. Результаты анализа представлены в табл.2.

## Результаты определения сорбционной емкости Рекицена - РД.

Исходный препарат	Концентрация красителя, мкг/мл		Коэффициент сорбции, ЕП
	исходная	после взаимодействия с Рекиценом -РД	
Рекицен-РД С-1	90±1	28±3	62±3
Рекицен-РД С-2	90±1	32±2	58±2
Рекицен-РД С-3	90±1	31±3	59±3

Примечания: 1. Средние значения концентрации красителя в опытных пробах и Кс определены с вероятностью в 95% по результатам четырех независимых экспериментов.  
2. Кс рассчитан на 1,0г Рекицена - РД.

**Таким образом, в результате проведенных исследований комиссия пришла к следующим выводам:**

1. Рекицен - РД обладает выраженной неспецифической токсиннейтрализующей активностью в отношении ботулинического типа А, шигеллезного (дизентерийного) токсинов, а также термолабильного диарейного энтеротоксина кишечной палочки;

2. Антитоксические свойства Рекицена - РД, очевидно, обусловлены его способностью связывать (сорбировать) белковые токсины, что подтверждается результатами анализа сорбционной активности Рекицена - РД в отношении красителя конго-рот ( $K_c=59,6\pm 4,95$ );

3. Полученные в ходе исследований результаты дают основание предположить, что Рекицен - РД будет обладать антитоксической активностью и в отношении других белковых токсинов биологического происхождения;

4. С учетом того, что термолабильный токсин кишечной палочки сходен по строению и свойствам с холерогеном, энтеротоксинами сальмонелл и некоторых других кишечных бактерий, препарат Рекицен - РД может оказаться эффективным средством профилактики и лечения пищевых отравлений различными белковыми токсинами. Для подтверждения этого предположения целесообразно провести дополнительные эксперименты на лабораторных животных, получающих корм, содержащий добавки токсинов и Рекицена-РД.

Председатель комиссии

Б.А. Рудой

Зам. председателя

А.В. Юрченко

Члены комиссии:

М.Ю. Луб

А.К. Федотов

Т.П. Повышева