

БИОМИМЕТИЧЕСКИЙ ПОДХОД К КОНСТРУИРОВАНИЮ ЗАЩИТНЫХ ПОКРЫТИЙ «ИСКУССТВЕННАЯ КУТИКУЛА» ДЛЯ ИНКУБАЦИОННЫХ ЯИЦ

Е. А. Самохина, О. Г. Бордунова

Сумской Национальный аграрный университет, г. Сумы, Украина

Введение. Одним из перспективных подходов в современном промышленном птицеводстве является разработка технологий по обогащению *in ovo* инкубационных яиц питательными веществами, витаминами и стимуляторами роста, а также проведению вакцинации *in ovo* [1]. Указанные технологии предусматривают введение биологически-активных веществ (БАВ) в яйцо при использовании механического действия (посредством укола иглой дозатора), что нарушает целостность защитного биокерамического барьера яйца – скорлупы, так и с использованием неdestructивных методов транспортировки БАВ. Примером технологии первого типа являются многоканальные шприцевые дозаторы Embrex, США, технологии второго типа предусматривают использование в процессах транспорта БАВ физико-химических факторов, в частности диффузионных процессов (погружение яиц в растворы БАВ перед инкубацией) [2] и действие ультразвука (фонофорез, сонофорез) [3]. Альтернативным вариантом является технология «искусственная кутикула» («ARTificialcutiCLE» – ARTICLE) для инкубационных яиц, разработанная О. Г. Бордуновой и сотр. [4]. Следует отметить, что природная кутикула состоит из большого количества гликопротеинов, пигментов, которые придают цвет яйцам и кристаллов гидроксиапатита. «ARTICLE» представляет собой поликомпонентное защитное покрытие для восстановления барьерных свойств биокерамических структур скорлупы и её мембран, которому присущи биоцидная (антибактериальная и антивирусная), а также биостимулирующая в отношении развивающегося эмбриона, виды активности [5]. Ключевым звеном технологии «ARTICLE» является конструирование нового лекарственного и профилактического способа защиты инкубационных яиц по биомиметическому принципу, то есть максимально приближенного к природным защитным барьерам яйца, на основе технологий модификации и иммобилизации молекул биологически активных, касательно эмбрионов птиц, веществ с целью пролонгирования их действия и защиты от преждевременного разрушения [6]. В качестве биологически-активных ингредиентов в технологии «ARTICLE» используют БАВ преимущественно природного происхождения (в частности, растительные экстракты), которым присущи как биоцидные в отношении патогенной микрофлоры, так и стимулирующие в отношении развивающихся эмбрионов, свойства. БАВ при- 509 родного происхождения в настоящее время уделяется большое внимание, учитывая тенденцию к снижению использования в птицеводстве стран ЕС антибиотиков, в первую, и экологическую безопасность, а также высокую биологическую активность природных препаратов, во вторую. Отметим, что оптимизация химического состава «ARTICLE» не проведена в полном объеме; механизмы образования защитного покрытия и кинетические параметры контролируемого высвобождения из них БАВ по принципу «ControlReleaseTechnology» детально не изучены. Цель работы Изучение особенностей микроструктуры разных видов «ARTICLE», которые образуются на поверхности скорлупы яиц, при условиях использования разных технологий их построения и влияния иммобилизованных молекул БАВ, которые входят в состав супрамолекулярных систем «ARTICLE», через биокерамические защитные барьеры яиц. Даная работа выполнена согласно тематики 0119U100551. Материалы и методы исследований В работе использовали инкубационные яйца кур (Хайсекс браун; 15 неделя яйцекладки), полученные от птиц, которых содержали в соответствии с принятыми нормами содержания и кормления; суммарный растительный экстракт (РЭ), который состоял из равных объёмов экстрактов, полученных с таких биологически-активных компонентов: грецкого ореха – *Juglans regia*; элеутерококка колючего – *Eleuterococcus senticosus* Maxim; эхиноцеи

пурпурной – *Echinacea purpurea* Moench; зверобоя обыкновенного – *Hypericum perforatum* L.; золотого корня – *Rhodiola rosea* L.; лимонника китайского – *Schisandra chinensis* Baill.; календулы – *Calendula officinalis* L.; мяты перечной – *Mentha piperita*; полыни горькой – *Artemisia absinthium* L.; ромашки лекарственной – *Chamomilla* L.; сосны лесной – *Pinus sylvestris* L.; тополя чёрного – *Populus nigra* L.; хмеля обычного – *Humulus lupulus* L.; экстракта из виноградных косточек – (10 % водный раствор); водорастворимые четвертичные аммониевые соединения (ЧАС) (алкилтриметиламмоний-хлорид, техн., алкилдецил-бензиламмоний-хлорид (АДМБ), дидецилдиметилбензиламмоний-хлорид (ДДМБ) «Sigma», США, надуксусная кислота (НУК), поливинилпирролидон; янтарная кислота, циклодекстрины «Serva», Германия; мелиттин «Sigma», США; бетаин из сахарной свеклы; томатын; фосфолипиды сои и куриных яиц; каротин из моркови и биомассы *Blakeslea trispora*; L-ментол, D-лимонен, ментон, карвон «Serva», Германия. Рабочий раствор для приготовления «искусственной кутикулы» получали, добавляя к 600 мл 10 % водного экстракта РЭ 200 мл 5% раствора соответствующего ЧАС, 50 мл этанола, 50 мл 20% H₂O₂ и 100 мл 20% надуксусной кислоты (НУК) с последующей обработкой ультразвуком в лабораторной звуковой бане УП – 1 (44кГц, 1,5Вт/см²), длительностью 5 минут 510 или электрохимической активацией по методу [8]. «Искусственную кутикулу» на поверхности инкубационных яиц получали путем: а) опрыскивание яиц рабочим раствором (диаметр капель аэрозоля 50–200 мкм) с последующим высыханием раствора и получением твердофазной пленки; б) фонофоретическим методом (усовершенствованная технология В. Акоюн и др. [3] и в) обработка яиц по технологии электрораспыления «electrospray» (диаметр капель аэрозоля 200 нм – 1 мкм; напряжение + 7 кВ, модифицированный прибор УНП). Проницаемость защитных биокерамических структур яиц касательно газовой фазы воздуха, проводили масс-спектрометрическим методом (массспектрометр газовый МХ–7304А) с использованием искусственных кальцитных мембран, полученных по методу J. Dominguez-Vera et al. [7]. Кинетические параметры транспортирования БАВ через биокерамические барьеры яиц рассчитывали, определяя концентрации БАВ на поверхности и в середине яйца масс-спектрометрическим методом. Структурные характеристики «искусственной кутикулы» исследовали электронной микроскопией (просвечивающие микроскопы ПЭМ–У и ПЭМ–125К). Результаты экспериментов (не менее n=5–8) обрабатывали статистически с использованием пакета StatisticaforWindows 5,1. и Origin 6.0. Результаты исследований В предыдущих работах авторов, было экспериментально доказано, что базовая процедура технологии «искусственная кутикула» – покрытие инкубационных яиц слоем матричного вещества на основе водорастворимых ЧАС приводит к образованию на поверхности яиц достаточно плотной плёнки. Толщина, её составляет от 0,05 до 15–20 мкм, которая покрытой извилистыми микротрещинами, которая в той или другой степени затрудняет поступление вовнутрь яйца патогенной микрофлоры и оказывает влияние на кинетические параметры диффузии газов через биокристаллический слой скорлупы [8–9]. Несмотря на многократно показанную высокую эффективность препаратов на основе ЧАС в борьбе с инфекционными заболеваниями птиц, им присуще и отрицательное действие на эмбрионы, обусловленное как раз затрудненными процессами диффузии кислорода, диоксида углерода и других газов через упомянутый слой. Последнее обстоятельство вынуждает существенно модифицировать как состав препаратов, который образует «ARTICLE», так и технологии их нанесения на яйцо. Относительно состава «искусственной кутикулы», то перспективным оказалось дополнение матричного вещества (ЧАС) БАВ природного и искусственного происхождения, которые используются в технологиях инкубации, с целью контролирования процессов эмбриогенеза, предупреждения заражения яиц инфекционными агентами, управления газообменом на протяжении всего процесса инкубации и даже перединкубационного корректирования пола птицы ингибиторами ароматазы. Нами использовано преимущественно БАВ растительного происхождения, 5 обусловленное, в первую очередь доступностью сырья и очень широким спектром биостимулирующих и биоцидных видов активностей. Отметим, что в зависимости от состава и концентрации отдельных ингредиентов в полученном препарате для получения

«ARTICLE» и технологии конструирования последней на поверхности яйца, как структура защитной пленки, так и барьерные свойства ее касательно газов и органических молекул, а также ионов неорганических веществ, существенно изменяются. Основанием для этого можно считать экспериментально доказанную В. Поканевич и др. [9] способность PE модифицировать свойства белково-липидных биомембран. Доказано также, что варьирование состава исходного раствора для конструирования «ARTICLE» влияет на морфологические параметры защитной пленки. В частности слой ЧАС вызывает затрудненную диффузию газов через него в сравнении с природной кутикулой. Причина этому характерная для ЧАС молекулярная организация, которая приводит к образованию на твердофазных поверхностях плотных многослойных покрытий. Так, ЧАС, которые используют в технологии «ARTICLE», отвечают формулам $C_nH_{2n+1}N(CH_3)_3Cl$ z $n = 12-18$. В воде такие молекулы диссоциируют с образованием алкиламмониевого катиона с гидрофильной «головой» $[N(CH_3)_3]^+$ и гидрофобным нейтральным «хвостом» $[CH_2(CH_2)_{n-1}]$. Даже при очень малых концентрациях в воде ионы ЧАС образуют цилиндрические мицеллы, поверхность которых приобретает положительный заряд. При введении в такой мицеллярный раствор отрицательно заряженных неорганических и органических комплексов эти анионы сорбируются на поверхности мицеллы, выталкивая собственные противоионы ЧАС. Одновременно такие мицеллы самопроизвольно образуют регулярную гексагональную упаковку; микроструктура таких пленок очень похожа на сферические и цилиндрические мицеллы, в форме которых упомянутые соединения существуют в растворах; латеральные бислоиные структуры, которые, как правило, образуют липиды, в данном случае не имеют места. Морфологические изменения микроструктур плёнок индуцирует смена противоионов. Так, добавление к исходному раствору ЧАС растительных экстрактов, фосфолипидов и надуксусной кислоты приводит к образованию поликомпонентных эмульсий, которые являются основой для конструирования более сложных и разрыхленных супрамолекулярных структур, которые, сохраняя биоцидную активность, значительно интенсифицируют процессы диффузии газов через биокристаллические слои инкубационного яйца. Кривые диффузии газов через модельные биокристаллические слои, подобные соответствующим структурам яйца птиц, свидетельствуют о том, что наиболее оптимальными в аспекте степени имитации параметров диффузии газов, присущей природной кутикуле, являются пленки, образовавшиеся из растворов ЧАС, РЭ и НУК, которые подверглись обработке ультразвуком и были нанесены на поверхность скорлупы методами простого ультрамикрочапельного распыления или электрораспыления. Пленка, которая образовалась при фазовом переходе с водного раствора чистого ЧАС, достаточно плотная, что и вызывает недостаточное поступление к эмбриону кислорода и выведение из яйца диоксида углерода на протяжении инкубации. С другой стороны, нанесение защитной пленки методом фонофореза повлекло резкое усиление диффузных процессов газа через биокристаллический слой, что может оказаться полезным в конструировании «ARTICLE» для инкубационных яиц водоплавающих птиц, которые отличаются плотными защитными биокерамическими структурами и, соответственно, характеризуются плохой выводимостью. Однако, технологии фонофоретической обработки принадлежит первенство в аспекте эффективности транспорта БАВ в середину инкубационного яйца, при условии отсутствия механических повреждений биокристаллического слоя (см. таблицу). Сравнение степени влияния физико-химических факторов/процессов на интенсивность транспортирования БАВ через биокерамические защитные слои яйца Физико-химические факторы/процессы, которые оказывают влияние на интенсивность транспортирования БАВ через скорлупу яиц Массовый % БАВ, поступившего вовнутрь яйца (от исходной концентрации БАВ на внешней поверхности) Контроль (интенсивность диффузии БАВ при условиях одинаковых температур снаружи и в середине яйца) 0,01–0,05 Свободная диффузия БАВ при условиях повышенной температуры в середине яйца 1–3 Циклодекстрины 11–14 L-ментол, ментон, карвон, D-лимонен 55–63 Диметилсульфоксид 64–69 ЧАС 7–11 Гидравлический удар 20–24 Электрораспыление 30–35 Электрофорез 56–62 Фонофорез (сонофорез, ультразвуковая обработка) 75–88 Как видно из таблицы 1, наиболее перспективными факторами для

недеструктивного перенесения БАВ через биокристаллический слой, являются растительные терпены (L-ментол, ментон, карвон, D-лимонен), которые уже используются в биотехнологии как усилители транспорта БАВ через природные защитные структуры (кожа, биокерамика и др.) [10] и диметилсульфоксид. Определенный потенциал в упомянутом направлении принадлежит также циклодекстринам. Кинетические кривые высвобождения БАВ из «ARTICLE», свидетельствует в пользу разных механизмов высвобождения. Применение уравнения $Mt/M = k \times t^n$, где Mt/M – часть БАВ, извлеченного с матричного вещества за время t ; k – кинетическая константа и n – экспонента, которая относится к механизму высвобождения [9], дало возможность утверждать, что механизм высвобождения БАВ можно считать диффузионным (в соответствии с законом Фика) только в случае использования «ARTICLE», в состав которой входят ЧАС и РЭ ($n=0,52$; $k=0,22$). Все другие полученные кривые предоставляют достаточные основания считать механизмы высвобождения БАВ такими, в которых диффузия играет второстепенную роль. Так, высвобождение БАВ «ARTICLE», полученной фонофорезом, или добавлением к базовому составу «ARTICLE» терпенов, РЭ и НУК приводит к значительному ускорению высвобождения БАВ, индуцированного химической/физической деструкцией пленки «искусственная кутикула». При этом скорость деструкции прямо коррелирует со скоростью высвобождения БАВ, в нашем случае наибольшей для фонофоретической технологии конструирования «ARTICLE». Учитывая результаты R. Wada и других [10], можно объяснить это явление тем, что механическое и сонохимическое действие фонофореза, а также химическая активность, которая присуща терпенам и мощному окислителю НУК, приводит к снижению молекулярной массы базовых компонентов «ARTICLE», точнее супрамолекулярных ансамблей ЧАС в твердофазной пленке. Касательно технологий, использующихся для интенсификации транспортных процессов, то первенство принадлежит фонофоретической технологии, которая несколько уступает электрофорезу и технологии «гидравлического удара». Заключение Исследования показали, что защитные покрытия «искусственная кутикула» «ARTICLE», сформированных на поверхности инкубационных яиц сельскохозяйственных птиц при условиях использования различных технологий их конструирования, свидетельствуют о том, что наиболее оптимальными в аспекте биомиметического моделирования физико-химических параметров, присущих природной защитной кутикуле яиц птиц, являются пленки, которые образовались из исходных растворов ЧАС, РЭ и НУК, подвергнутых обработке ультразвуком и нанесенных на яйцо методами ультрамикрочапельного распыления или электрораспыления. Разработан оптимальный состав ингредиентов для конструирования «ARTICLE» на поверхности инкубационного яйца. Доказано, что в качестве молекулярных «усилителей» недеструктивного транспортирования БАВ через биокристаллический защитный слой яйца, наиболее оптимальны растительные терпены (L-ментол, ментон, карвон, D-лимонен); а использование ультразвука в технологии фонофоретического транспортирования БАВ обеспечивает поступление его наибольшего количества вовнутрь яйца за единицу времени. Литература 1. In ovo Administration of Recombinant Human Insulin – Like Growth Factor – I Alters Postnatal Growth and Development of the Broiler Chicken / H. Kokamic, D. C. Kirkpatrick-Keller, H. Klandorf, J. Killefer // Poultry Science. – 2006. – Vol. 77. – P. 1913–1919. 2. Дяченко, Л. С. Ефективність селену передінкубаційній обробці яєць і годівлі курчат / Л. С. Дяченко, Ю. О. Погібельна // Вісник аграрної науки. – 2003. – № 8. – С. 37–40. 3. Фонофорез антибиотиков в яйцо / В. Акопян, О. Рыхлецкая, Г. Зарубина, Ле Тхи Фьонг Лян // Птицеводство. – 2000. – № 3. – С. 34. 4. Препарат для дезинфекции яиц / О. Г. Бордунова [и др.] // Птицеводство. – 1999. – № 9. – С. 5–6. 514 5. Bordunova, O. G. Experimental and theoretical studies of surface-active disinfectant for industrial poultry / O. G. Bordunova, A. B. Baidevlatov // Quality of Eggs and Eggs Products (Proceedings of the European Symposium held in Bologna (19 th to 23 rd September, 1999, Italy). – Vol. II. – P. 595–601. 6. Екологічно безпечні дезінфектанти для птахівництва / О. Г. Бордунова [та інші] // Вісник аграрної науки. – 2001. – № 7. – С. 30–33. 7. Dominguez-Vera, J. M. The Effect of Avian Uterine Fluid on the Growth Behavior of Calcite Crystals / J. M. Dominguez-Vera, J. Gautron, Y. Nys // Poultry Sci. – 2000. – Vol. 79. – P. 901–907. 8. Бордунова,

- О. Г. Деякі аспекти молекулярного механізму біоцидної дії дезінфектанта «ВВ-1» / О. Г. Бордунова, Ю. А. Байдевятов, В. Д. Чіванов // Вісник аграрної науки. – 1999. – № 12. – С. 43–45.
9. Характеристика мембранотропних властивостей екстрактів фітопрепаратів / В. В. Поканевич, Г. В. Островська, Т. П. Гарник, В. К. Рибальченко // Доп. НАН України. – 2001. – № 8. – С. 152–158.
10. Wada, R. Kinetics of diffusion-mediated drug release enhanced by matrix degradation / R. Wada, S.-H. Hyun, Y. Ikada // J. Control. Release. – 1999. – Vol. 37. – P. 151–160. УДК 636.4:519.22(076)