

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ  
ІНСТИТУТ МІКРОБІОЛОГІЇ І ВІРУСОЛОГІЇ ім. Д.К. ЗАБОЛОТНОГО

**СТАРОВОЙТОВА СВІТЛАНА ОЛЕКСАНДРІВНА**

УДК 579.864.1:615.331

**РОЗРОБКА КОМПОЗИЦІЇ ПОЛІШТАМОВОГО ПРОБІОТИКУ  
НА ОСНОВІ БАКТЕРІЙ РОДУ *LACTOBACILLUS***

03.00.20- біотехнологія

**АВТОРЕФЕРАТ**

дисертації на здобуття наукового ступеня  
кандидата біологічних наук

Київ – 2008

Дисертацією є рукопис

Робота виконана на кафедрі промислової біотехнології Національного технічного університету України «Київський політехнічний інститут»

**Науковий керівник:** доктор біологічних наук, доцент, **Горчаков Володимир Юрійович**, Національний технічний університет України «Київський політехнічний інститут», професор кафедри промислової біотехнології

**Офіційні опоненти:** доктор біологічних наук, професор, **Пирог Тетяна Павлівна**, Національний університет харчових технологій, завідувач кафедри біотехнології мікробного синтезу;

доктор технічних наук, **Кігель Наталя Федорівна**, Технологічний інститут молока і м'яса УААН, завідувач відділу біотехнології

Захист відбудеться 19 листопада 2008 р. о 12<sup>00</sup> годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.233.01 по захисту докторських дисертацій при Інституті мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України за адресою:  
Д 03680, м. Київ, ДСП, вул. Заболотного, 154, зал засідань.

З дисертацією можна ознайомитися у бібліотеці Інституту мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України за адресою : Д 03680, м. Київ, ДСП, вул. Заболотного, 154.

Автореферат розісланий “16” жовтня 2008 року.

Вчений секретар  
спеціалізованої вченої ради,  
кандидат біологічних наук,  
старший науковий співробітник

Пуріш Л.М.

## ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

**Актуальність теми.** За останні роки опубліковано велику кількість робіт щодо становлення, складу, сукцесії симбіотичної мікрофлори хазяїна, біохімічних реакцій, фізіологічних функцій та патологічних станів, пов'язаних з нею, принципів та прийомів корекції екосистеми «хазяїн та його мікрофлора» [Шендеров, 2001]. Аналіз цих даних свідчить, що в природних умовах існування немає жодного біохімічного процесу, жодної функції живих організмів, які б здійснювалися без прямої чи опосередкованої участі симбіотичних мікроорганізмів. Вони є головним біогенним фактором, що визначає здоров'я та розвиток захворювань організму [Шендеров, 2003, Holzapfel, Shillinger, 2002, Wyers, 2004, Смирнов и др., 2002].

Полівидовий склад облигатної мікрофлори усіх екосистем організму людини вказує на доцільність конструювання поліштамових пробіотиків, що концентрують в собі широкий спектр біотерапевтичних функцій [Шендеров Б.А., 2001, Бондаренко, 2007, Янковський, 2005, 2006].

Пробіотична мікрофлора здатна проявляти активність в оптимальних для неї екосистемах, витісняючи з них випадкову мікрофлору лише у вигляді взаємовигідних мікробних консорціумів [Бондаренко, 2007, Янковський, 2005, 2006].

Конструювання комплексних пробіотиків ґрунтується на тому, що для кожної особи, яка застосовує такий препарат, створюються сприятливі умови для відбору з нього представників тих видів лактобактерій, які в його кишечнику знаходяться в дефіциті [Шендеров, 2001]. Систематичне застосування пробіотиків підвищує колонізаційну резистентність, посилює імунітет, запобігає розвитку алергічних ускладнень, нормалізує пул гістаміну та щавлевої кислоти, чинить гіпохолестеринемічний, антимуутагенний, протипухлинний та інші позитивні ефекти на макроорганізм [Смирнов и др., 2002, Бондаренко, 2007, Янковський, 2005, 2006, Holm, 2003, Saarela et al., 2002].

Отже, створення та застосування поліштамових пробіотиків є на сьогодні стратегічним напрямком в боротьбі з багатьма інфекційними та деякими неінфекційними захворюваннями. Враховуючи комерційну цінність та високу рентабельність пробіотиків, вони є досить актуальними для фармацевтичної промисловості України в цілому.

**Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.** Дисертаційна робота виконана в рамках двох індивідуальних проектів: Грант НТУУ «КПІ» №3/12 «Конструювання мультикомпонентного бактеріотерапевтичного препарату на основі молочнокислих бактерій роду *Lactobacillus* для застосування в ортопедичній та отоларингологічній практиці» на 2006-2007рр. (Наказ по НТУУ «КПІ» №2-174 від 30.10.2006р.) та Грант Президента України для обдарованої молоді №4/2007 «Дизайн (конструювання) багатокомпонентного пробіотичного препарату на основі молочнокислих бактерій» на 2007р. (Розпорядження Президента України Про призначення грантів Президента України для обдарованої молоді на 2007 рік №19/2007-рп від 30 січня 2007 року), а також Інноваційного проекту №7 «Розроблення та впровадження технологій виготовлення біологічно активних речовин мікробного походження мультифункціонального призначення» на 2007-2009рр. (Розпорядження Кабінету Міністрів України №760-р від 19 вересня 2007р.).

**Мета та завдання досліджень.** Мета роботи – розробка композиції поліштамового пробіотику на основі бактерій роду *Lactobacillus*.

У відповідності з поставленою метою були сформульовані такі завдання:

- здійснити відбір лактобактерій до основи пробіотику за пробіотичними показниками: антагонізм щодо патогенної та умовно-патогенної мікрофлори хазяїна, адгезивні властивості, резистентність до дії антибіотиків та агресивних умов шлунково-кишкового тракту (ШКТ);
- встановити мутагенні/ антимуутагенні ефекти лактобактерій;
- вивчити гіпохолестеринемічну та протеолітичну активність лактобактерій;
- визначити біосумісність лактобактерій між собою та створити композицію лактобактерій з високими показниками пробіотичних властивостей;
- встановити мікроелементний склад лактобактерій та їх здатність адсорбувати іони важких металів;
- вивчити імуномодуючі властивості відібраної композиції лактобактерій;

- розробити методику одержання спектрально-динамічних характеристик (СДХ) лактобактерій за допомогою комплексу медичного експертного (КМЕ) та дослідити перспективні біотерапевтичні ефекти (ПБЕ) лактобактерій та композицій на їх основі.

*Об'єкт дослідження* –штами бактерій роду *Lactobacillus*.

*Предмет дослідження* – пробіотичні властивості бактерій роду *Lactobacillus*.

*Методи дослідження* – сучасні мікробіологічні, біохімічні, імунологічні, генетичні, біотехнологічні, фізичні та комп'ютерного моделювання. Отримані в ході експериментів результати обробляли відповідними статистичними методами.

**Наукова новизна одержаних результатів** полягає в розробці композиції поліштамового пробіотику на основі бактерій роду *Lactobacillus*, яка поряд з класичними пробіотичними властивостями має унікальні властивості, а саме генопротекторні (високий антимутагенний ефект) та здатність до сорбції іонів важких металів і, як наслідок виведення їх з організму хазяїна.

Вперше для створення пробіотику застосовано метод спектрально-динамічного аналізу. Показано тотожність результатів отриманих класичними мікробіологічними методами та методом спектрально-динамічного аналізу. Вперше методом спектрально-динамічного аналізу за допомогою відповідних баз даних комплексу медичного експертного, що входять до сімейства програм “Doctor’s assistant”, досліджено потенційні біотерапевтичні ефекти бактерій роду *Lactobacillus* на різноманітні органи та системи організму людини.

Показано можливість регуляції (стимуляції/пригнічення) росту лактобактерій методом спектрально-динамічного аналізу за допомогою комплексу медичного експертного.

**Практичне значення одержаних результатів.** Розроблена композиція не виявила токсичності в дослідах *in vivo* / *in vitro* та після проведення ряду відповідних досліджень може бути рекомендована до використання, як лікарський засіб для пробіотикопрофілактики та пробіотикотерапії населення України.

Розроблено методику одержання спектрально-динамічних характеристик біооб'єктів. Створено базу спектрально-динамічних характеристик лактобактерій і патогенних та умовно-патогенних мікроорганізмів. Показано можливість застосування методу спектрально-динамічного аналізу для з'ясування перспективних напрямків терапевтичних ефектів лактобактерій та їх композицій для прискорення подальшого проведення клінічних досліджень на пацієнтах.

Результати досліджень, проведених в роботі, використано у навчальному процесі на кафедрі промислової біотехнології Національного технічного університету України «Київського політехнічного інституту», що підтверджується відповідним актом, наведеним в додатку.

**Особистий внесок здобувача.** Експериментальна робота, обробка та аналіз одержаних результатів досліджень, підготовка матеріалів досліджень і публікацій здійснено безпосередньо здобувачем.

Здобувачем особисто досліджено основні пробіотичні властивості лактобактерій (антагонізм; продукування органічних кислот, перекису водню, лізоциму; адгезивність; резистентність до дії антибіотиків та агресивних умов ШКТ; відсутність мутагенної та наявність антимутагенної активності; харчові потреби; гіпохолестеринемічна активність та протеолітична дія, а також біосумісність лактобактерій між собою). Здійснено розробку методики отримання спектрально-динамічних характеристик біооб'єктів за допомогою комплексу медичного експертного. Досліджено можливість використання методу спектрально-динамічного аналізу як альтернативи традиційним мікробіологічним методам для конструювання пробіотиків. Здобувачем особисто вивчено потенційні біотерапевтичні ефекти лактобактерій за допомогою відповідних баз даних комплексу медичного експертного. Досліджено вплив фізичних методів обробки клітин на регуляцію росту лактобактерій.

Спільно із «СПД-ФО Мусиенко Т.В.» створено базу спектрально-динамічних характеристик лактобактерій.

Вивчення імуномодельюючих властивостей розробленої композиції лактобактерій проводили спільно з відділом проблем інтерферону та імуномодуляторів, Інституту мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України, м.Київ, а саме з член-кор. НАНУ, проф., д.б.н. Співаком М.Я. та к.б.н. Тимошок Н.О., які є співавторами публікацій.

Здобувачем підготовано зразки проб для вивчення мікроелементного складу лактобактерій та їх здатності адсорбувати іони важких металів, які досліджували спільно з Науково-технічним центром «Bipia Ltd.», м. Київ.

Планування напрямку роботи, формування положень і висновків дисертаційної роботи проведено під керівництвом д.б.н. В.Ю. Горчакова.

**Апробація результатів дисертації.** Основні результати досліджень та положення дисертації доповідалися та обговорювалися на IV Міжнародній науково-практичній конференції «Валеологія: сучасний стан, напрямки та перспективи розвитку» (Харків, 2006), Міжнародній науково-методичній конференції «Формування мотивації здорового способу життя та профілактики ВІЛ/СНІД засобами освіти» (Київ, 2006), III Всеукраїнській науково-практичній конференції з міжнародною участю «Биотехнология. Образование. Наука. Практика» (Харків, 2006), II Міжнародній конференції молодих вчених і студентів «Биомедицинская информатика, медицинская инженерия и телемедицина (новые взгляды, идеи и факты)» (Київ, 2006), V Міжнародній науково-практичній конференції «Валеологія: сучасний стан, напрямки та перспективи розвитку» (Харків, 2007), Загальноуніверситетській науково-технічній конференції НТУУ «КПІ» присвяченій Дню науки (Київ, 2007), III Міжнародній науковій конференції студентів та аспірантів «Молодь та поступ біології» (Львів, 2007), VIII Конференції молодих онкологів з міжнародною участю «Сучасні проблеми експериментальної і клінічної онкології» (Київ, 2007), X Міжнародній науково-практичній конференції студентів, аспірантів та молодих вчених «Екологія. Людина. Суспільство» (Київ, 2007).

**Публікації.** Результати дисертаційної роботи представлено в 21 науковій роботі (7 статей у фахових журналах та 3 - в матеріалах конференцій, 11 - в тезах доповідей).

**Структура та обсяг роботи.** Дисертаційна робота викладена на 178 сторінках машинописного тексту і складається зі вступу, огляду літератури, основної частини (включає матеріали і методи досліджень, результати досліджень та їх обговорення у 3 розділах), висновків, додатків, списку використаних джерел, що містить 245 джерел, з них 107 - іноземних авторів. Робота ілюстрована 42 таблицями і 17 рисунками.

## ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

Огляд літератури складається з трьох підрозділів, що висвітлюють: склад та функції мікробіоценозів різних біотопів людини, біологічні функції пробіотичних мікроорганізмів, а також опис пробіотиків та шляхи їх вдосконалення. Велику увагу приділено основним вимогам, які висуваються до пробіотичних мікроорганізмів та пробіотиків. Розглянуто класифікацію пробіотиків та основні перспективні напрямки їх розробки і вдосконалення.

## ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА

### Матеріали і методи досліджень

В якості об'єктів дослідження використано штами бактерій роду *Lactobacillus* з музею культур кафедри промислової біотехнології НТУУ «КПІ».

Відбір лактобактерій до композиції поліштамового пробіотику проводили за пробіотичними властивостями, використовуючи відповідні методи:

- антагоністичну активність щодо патогенних та умовно-патогенних мікроорганізмів вивчали методом перпендикулярних штрихів [Постникова и др., 2004]. Для встановлення механізму антагоністичної дії лактобактерій вивчали їх здатність до кислотоутворення титриметричним методом [Постникова и др., 2004], лізоцим-синтезуючу активність - методом агарових пластинок [Ленцнер и др., 1975] та продукцію перекису водню - титриметричним методом [Виноградова, 1977];
- адгезивну активність лактобактерій визначали розгорнутим (пробіорчним) методом [Брилис и др., 1986] на нативних та формалізованих еритроцитах крові людини. Результати оцінювали за індексом адгезивності мікроорганізмів (ІАМ);
- дослідження резистентності лактобактерій до дії антибіотиків проводили методом дифузії в агар [Егоров, 1995];

- стійкість до агресивних умов шлунково-кишкового тракту (ШКТ) встановлювали моделюванням поведінки лактобактерій в умовах ШКТ організму хазяїна при pH 1,5; 2,0; 2,5; 3,0 та 8,5 [Gotcheva et al., 2002], з концентраціями жовчі (20%, 30%, 40%), фенолу (0,4%, 0,5%), хлориду натрію (2%, 4%, 6%) [Рогов и др., 2003, Marteau et al., 1997], ферментів травлення (трипсин кристалічний 2мг%, хімотрипсин 2 мг%, комплексом ферментів: K1 -  $\alpha$ -амілаза - 2250 од FIP, ліпаза – 3000 од FIP, протеаза – 4500 од FIP; K2 -  $\alpha$ -амілаза - 4500 од FIP, ліпаза – 6000 од FIP, протеаза – 9000 од FIP), а також в шлунковому соку. Концентрації ферментів розраховані виходячи із вмісту шлунку натщесерце та разової дози ферментного препарату;

- гіпохолестеринемічну дію з'ясовували за здатністю лактобактерій використовувати холестерин в якості єдиного джерела вуглецю [Коваленко и др., 2004];

- протеолітичну активність визначали методом Фолпа [ГОСТ 20264.2-88];

- генопротекторну активність (відсутність потенційної мутагенної та наявність антимутагенної дії) досліджували в напівкількісному тесті Еймса [Дуган, 1985, Воробьева и др., 1991];

- біосумісність штамів лактобактерій між собою з'ясовували методом попарного культивування [Глушанова, Шендеров, 2005];

- визначення потенційних біотерапевтичних ефектів проводили методом спектрально-динамічного аналізу [КМЭ001.000.00 РЭ].

Імуномодуючі властивості розробленої композиції лактобактерій та препарату порівняння Лактобактерину вивчали на білих безпородних лабораторних мишах масою 16-18 г. Перерахунок концентрації препаратів для мишей робили методом [Рыболовлев и др., 1979]. Продукцію імуnoreгуляторних цитокінів: інтерферону (ІФН) та фактору некрозу пухлин- $\alpha$  (ФНП- $\alpha$ ) визначали мікрометодом [Лазаренко та ін., 2005] у інтактних та дослідних мишей. Мишей забивали методом цервікальної дислокації та одержували сироватку крові тварин, селезінку, спленоцити та макрофаги перитонеального ексудату (МФПЕ) [Дяченко и др., 1994]. Функціональний стан клітин фагоцитарної системи оцінювали *in vivo* та *in vitro* у мікроскопічному тесті та у тесті відновлення нітросинього тетразолію (НСТ-тест) [Дяченко и др., 1994]. Активність природних клітин кілерів (ПКК) визначали колориметричним методом проти мішеней L-929 [Кузовкова, 1991].

Протигерпетичну активність композиції лактобактерій вивчали на моделі експериментального герпетичного менінгоенцефаліту у мишей *Balb/c*. Мишей інфікували інтрацеребрально ВПГ-1 типу в дозі 100 ЛД<sub>50</sub>/0,025 мл (титр вірусу – 5log ЛД<sub>50</sub>). Препарати вводили по 0,5 мл *per os* на мишу в концентрації  $1 \cdot 10^9$  кл/мл за схемами: до інфікування та щодоби протягом 6-ти діб – профілактична; через 24 год після зараження вірусом – лікувальна. Оцінку активності препаратів проводили шляхом порівняння летальності в дослідній та контрольній групах.

Токсичність (нешкідливість) композиції лактобактерій визначали в дослідах *in vitro* мікроскопічним аналізом на культурі фібробластів L-929, тестикулів поросят ПТП та спленоцитів мишей.

Мікроелементний склад лактобактерій та їх композиції, а також їх здатність сорбувати іони важких металів вивчали рентгено-флуоресцентним аналізом на флуоресцентному спектрометрі «Elvax».

Для оцінки потенційних біотерапевтичних ефектів лактобактерій використовували метод спектрально-динамічного аналізу. Розроблено методику одержання спектрально-динамічних характеристик біооб'єктів. Методом спектрально-динамічного аналізу, паралельно з класичними мікробіологічними методами, досліджено відношення лактобактерій до джерел вуглецевого живлення, антагоністичну активність щодо патогенних та умовно-патогенних бактерій, біосумісність штамів між собою та їх потенційну біотерапевтичну дію на різні органи та системи організму людини.

Регуляцію (стимуляцію/пригнічення) росту лактобактерій фізичними методами проводили за допомогою комплексу медичного експертного та апарату «СЕМ Tech».

Статистичну обробку отриманих експериментальних даних проводили за допомогою комп'ютерної програми Microsoft Office Excel 2000XP за загально прийнятими методами [Бондар, Статюха, 1976, Бейли Н., 1962] з урахуванням t- критерію Ст'юдента ( $t(P,f)$ ) для надійної ймовірності  $P=95\%$  та  $99\%$  відповідно і числа ступенів свободи  $f=n-1$ .

### Дослідження пробіотичних властивостей лактобактерій

При розробці поліштамового пробіотику керувалися вимогами Комітету ООН з продовольчих питань і сільського виробництва (FAO) та Всесвітньої організації охорони здоров'я (WHO) [Agostoni et al., 2004, FAO/WHO, 2001, 2002] до пробіотичних мікроорганізмів та положеннями концепції створення мультипробіотиків [Янковский, 2005, 2006].

В ході проведення скринінгової роботи з 14 бактерій роду *Lactobacillus* відібрано 5 біосумісних штамів з високими показниками пробіотичних властивостей (табл.1).

Відібрані штами проявили високу антагоністичну активність щодо грампозитивних (зони затримки росту становили - 20,1-38,3 мм) та грамнегативних бактерій (19,2 – 42,3 мм). Антагоністична активність лактобактерій була обумовлена кислотоутворенням (170,0 – 210,8 °T), продукуванням лізоциму (*L. acidophilus* (C) – 5 мм) та інших біологічно активних сполук.

За показником ІАМ всі штами відносилися до високоадгезивних (ІАМ 4,16-6,57), окрім *L. acidophilus* (C), що належав до середньоадгезивних (ІАМ 3,23-3,34).

Практично всі досліджені штами лактобактерій проявили резистентність до дії більшості антибактеріальних препаратів взятих до експерименту. Частково ріст лактобактерій пригнічували лише антибіотики, що порушують синтез білку – макроліди та тетрацикліни. Це дає можливість використовувати пробіотики на основі лактобактерій, як препарати супроводу при антибіотикотерапії.

Відібрані штами, на відміну від референс-штаму *L. plantarum* (Лактобактерин), зростали на середовищі з холестеринном в якості єдиного джерела вуглецю, що опосередковано вказувало на їх гіпохолестеринемічну активність *in vivo*.

Високий рівень накопичення зовнішніх протеолітичних ферментів лактобактеріями (70,84-637,04 од/мг) вказує на можливість застосування пробіотиків при розладах травлення, пов'язаних з недостатністю відповідних ферментів в організмі хазяїна, а також для зміни імуногенності чужорідних білків шляхом їх протеолізу.

В напівкількісному тесті Еймса показано відсутність потенційної мутагенної активності продуктів метаболізму лактобактерій, а також високі антимуагенні властивості, які забезпечували пригнічення мутагенної дії модельного мутагену – азиду натрію на 58,43-99,03% (антимутагенна активність штаму порівняння

Таблиця 1

Основні пробіотичні властивості відібраних штамів лактобактерій

| Показник                         | Штами лактобактерій                       |                              |                                                                              |                                                                   |                           |                                            |
|----------------------------------|-------------------------------------------|------------------------------|------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------|---------------------------|--------------------------------------------|
|                                  | <i>L. rhamnosus</i><br>LB3 IMB B-<br>7038 | <i>L. acidophilus</i><br>(C) | <i>L. delbrueckii</i><br>subsp.<br><i>bulgaricus</i><br>LB86 BKIM-<br>B-5788 | <i>L. delbrueckii</i><br>subsp.<br><i>delbrueckii</i><br>DSM20074 | <i>L. rhamnosus</i><br>V® | <i>L. plantarum</i><br>(Лактобакте<br>рин) |
| Антагонізм, мм<br><i>E. coli</i> | 42,3±0,51                                 | 36,1±1,05                    | 37,9±1,23                                                                    | 36,6±1,21                                                         | 31,2±1,25                 | 30,4±1,37                                  |
| <i>P. fluorescens</i>            | 30,4±1,0                                  | 24,2±0,83                    | 27,8±0,94                                                                    | 26,8±0,97                                                         | 29,8±1,03                 | 20,2±0,96                                  |
| <i>A. colcoaceticus</i>          | 35,3±0,73                                 | 32,3±0,99                    | 20,9±0,71                                                                    | 21,2±0,83                                                         | 31,3±1,18                 | 10,9±0,47                                  |
| <i>S. marcescens</i>             | 36,4±1,12                                 | 19,2±0,52                    | 38,2±0,99                                                                    | 27,8±0,79                                                         | 33,4±1,22                 | 18,5±0,85                                  |
| <i>B. linens</i>                 | 30,7±1,09                                 | 28,8±0,74                    | 22,8±0,85                                                                    | 23,1±0,67                                                         | 34,2±1,07                 | 14,8±0,69                                  |
| <i>B. mycoides</i>               | 30,5±0,95                                 | 35,1±1,22                    | 34,7±1,13                                                                    | 32,4±1,18                                                         | 30,3±1,19                 | 23,1±1,04                                  |
| <i>B. megaterium</i>             | 33,2±1,21                                 | 20,1±1,07                    | 26,1±0,97                                                                    | 34,3±1,21                                                         | 24,3±0,98                 | 15±0,71                                    |
| <i>B. subtilis</i>               | 34,1±1,18                                 | 28,4±0,98                    | 20,9±0,81                                                                    | 29,8±0,99                                                         | 30,7±1,14                 | 20,5±0,93                                  |
| <i>B. cereus</i>                 | 37,7±2,07                                 | 33,4±0,83                    | 37,8±1,13                                                                    | 38,3±1,22                                                         | 30,4±1,17                 | 19,7±0,91                                  |
| <i>S. citreus</i>                | 37,5±1,17                                 | 34,6±1,15                    | 34,0±1,15                                                                    | 36,1±1,25                                                         | 36,4±1,15                 | 37,3±1,75                                  |
| <i>S. aureus</i>                 | 37,6±1,32                                 | 33,7±1,20                    | 34,7±1,24                                                                    | 32,4±1,18                                                         | 32,5±1,23                 | 33,6±1,59                                  |
| <i>N. carollina</i>              | 22,3±1,16                                 | 27,4±0,85                    | 31,1±1,18                                                                    | 20,3±0,76                                                         | 30,3±1,26                 | 11,2±0,41                                  |

|                                                     |              |              |            |            |            |             |
|-----------------------------------------------------|--------------|--------------|------------|------------|------------|-------------|
| <i>S. flava</i>                                     | 20,3±0,92    | 28,6±0,91    | 34,1±1,11  | 33,9±1,08  | 33,4±1,29  | 14,2±0,68   |
| Кислотоутворення, °T                                | 210,8±4,75   | 193,8±5,81   | 170,0±7,81 | 178,5±6,33 | 197,2±5,45 | 193,8±8,26  |
| Лізоцим-синтезуюча активність, мм                   | 0            | 5            | 0          | 0          | 0          | 0           |
| Адгезивність, ІАМ                                   |              |              |            |            |            |             |
| нативні еритроцити                                  | 5,08±0,23    | 3,23±0,11    | 4,93±0,17  | 5,09±0,25  | 6,57±0,28  | 4,26±0,21   |
| формалізовані еритроцити                            | 4,21±0,18    | 3,34±0,08    | 4,16±0,18  | 4,93±0,22  | 6,0±0,29   | 4,07±0,19   |
| Антибіотико резистентність, зони затримки росту, мм |              |              |            |            |            |             |
| бензилпеніцилін                                     | 2±0,07       | 0            | 0          | 11±0,52    | 3±0,12     | 8±0,33      |
| ампіцилін                                           | 0            | 0            | 0          | 0          | 0          | 18±0,75     |
| амоксацилін                                         | 0            | 0            | 4±0,11     | 13±0,59    | 7±0,35     | 18±0,78     |
| цефазолін                                           | 0            | 0            | 0          | 11±0,55    | 5±0,21     | 11±0,52     |
| амікацин                                            | 0            | 0            | 0          | 6±0,28     | 0          | 0           |
| гентаміцин                                          | 4±0,13       | 0            | 9±0,44     | 11±0,49    | 7±0,36     | 0           |
| стрептоміцин                                        | 7±0,34       | 0            | 3±0,08     | 7±0,31     | 0          | 0           |
| лінкоміцин                                          | 17±0,75      | 5±0,22       | 9±0,24     | 25±1,14    | 13±0,54    | 22±1,04     |
| доксидиклін                                         | 0            | 0            | 0          | 9±0,38     | 7±0,32     | 21±0,73     |
| левофлоцин                                          | 4±0,17       | 0            | 2±0,06     | 5±0,24     | 0          | 6±0,28      |
| левоміцетин                                         | 0            | 3±0,14       | 0          | 4±0,18     | 4±0,17     | 20±0,97     |
| Антимутагенна дія, %                                | 99,03±2,87   | 58,43±1,99   | 90,38±3,12 | 95,90±4,05 | 81,22±3,98 | 60,0±2,55   |
| Протеаза, од/мг                                     | 637,04±17,13 | 339,13±15,01 | 74,82±2,34 | 492,5±9,81 | 70,84±3,42 | 163,64±6,72 |

становила менше 60%). Встановлено, що лактобактерії мають десмутагенний ефект, який проявляється в здійсненні хімічних та біологічних модифікацій мутагенів позаклітиною.

Однією з ключових характеристик пробіотику вважають здатність його клітин в життєздатному стані досягати області товстої кишки і тривалий час проявляти в ній функціональну активність. Моделювання поведінки лактобактерій в умовах ШКТ виявило їх стійкість до зміни рН середовища у широких межах 1,5-8,5, секреторних рідин (жовчі, шлункового соку), ферментів травлення та деяких хімічних сполук (хлорид натрію, фенол) (рис.1, 2).

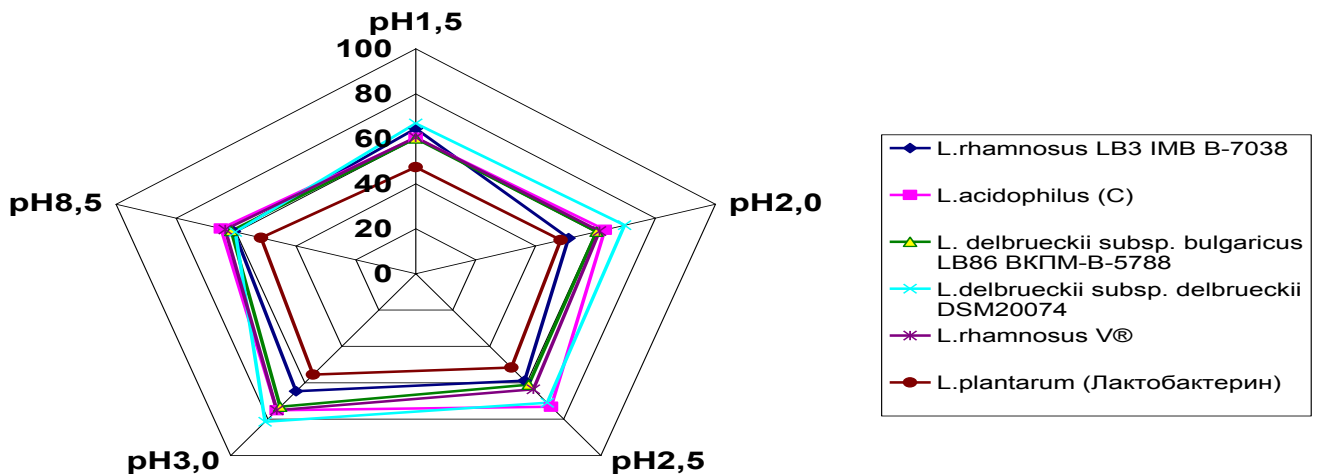


Рис.1. Виживання лактобактерій (%) під дією фізіологічних значень рН ( $P < 0,05$ ).



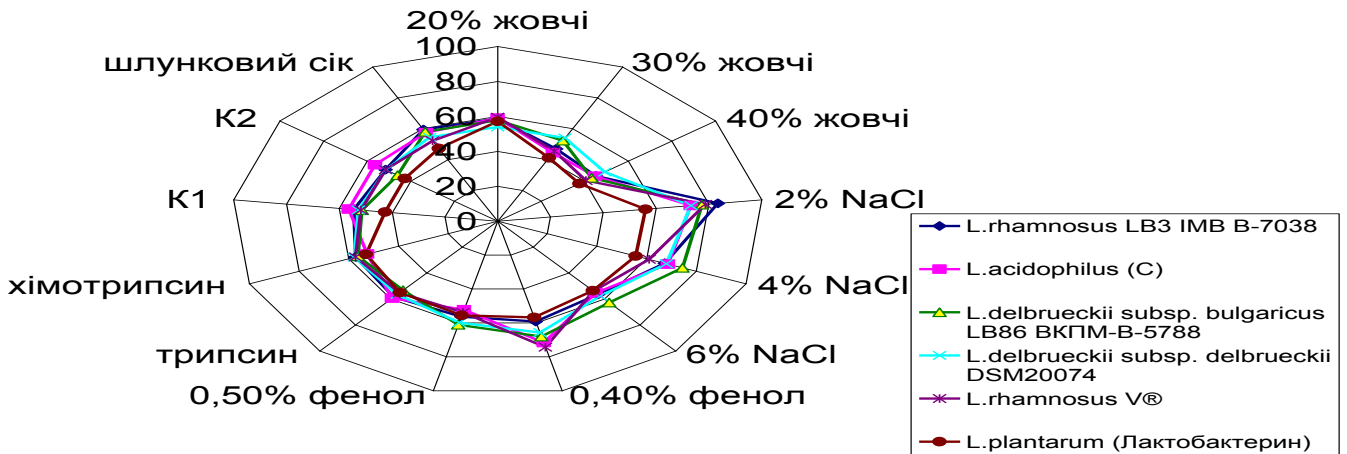


Рис.2. Виживання бактерій (%) під дією різних агресивних факторів ШКТ ( $P < 0,05$ ).

Оскільки штами лактобактерій відібрані до композиції здатні були асимілювати деякі однакові джерела вуглецевого живлення вивчено ріст культур при безперервному культивуванні на середовищі з глюкозою, для виключення можливості конкуренції за джерела вуглецю. Розрахунок питомих швидкостей росту лактобактерій показав, що досліджені штами мали практично однакові значення, які варіювали у межах 0,092-0,117. Це може свідчити про те, що при наявності в середовищі культивування одного джерела вуглецевого живлення вони не повинні конкурувати за нього навіть знаходячись в композиції.

Таким чином, аналіз основних пробіотичних властивостей відібраних лактобактерій виявив, що вони, на відміну від референс-штаму *L. plantarum* (Лактобактерин), мали вищу резистентність до дії агресивних умов ШКТ, більшу антимутагенну активність та здатні були зростати на середовищі з холестерином.

### Застосування спектрально-динамічних характеристик біооб'єктів при конструюванні пробіотиків

При розробці пробіотиків важливим етапом є доклінічні дослідження. Оскільки такі дослідження є досить вартісними та трудомісткими, альтернативним методом може стати метод СДА, який дозволяє оцінити потенційні біотерапевтичні впливи розробленої композиції пробіотику на різноманітні органи та системи організму людини та тим самим прискорити фармрозробку пробіотиків. Цей метод реалізується за допомогою КМЕ. СДА – дозволяє розробити принципи комп'ютерного моделювання майбутніх проб та проводити інтерактивні дослідження (прогнозування) їх майбутніх властивостей та фізіологічної дії.

Зараз в усьому світі проводяться масштабні дослідження, мета яких – застосування методів спектрального аналізу в медицині та суміжних галузях. Не дивлячись на значний прогрес в цій галузі, існуючі технології спектрального аналізу мають принциповий недолік – інвазивність діагностичних методів. Цей недолік усунений в КМЕ, який пройшов випробування в атестованих медичних установах не лише України, а і Європи, де було підтверджено ефективність його медичного застосування. КМЕ – спектрально-динамічний програмно-апаратний комплекс, дозволяє проводити прогноз та діагностику за параметрами фазових площин динамічної системи. Він забезпечує високу ступінь індивідуальності підбору оздоровчих, профілактичних та лікувальних засобів на основі принципу компліментарності за рахунок оцінок відповідності динамічних спектрів препаратів та організму пацієнта.

Для можливості реалізації методу СДА розроблено методику одержання спектрально-динамічних характеристик (СДХ) біооб'єктів. Встановлено, що СДХ біооб'єкту практично не залежали ні від зовнішніх, ні від фізіологічних факторів, що свідчить про універсальність методу і про можливість його використання в подальших мікробіологічних дослідженнях. Створено бази даних СДХ лактобактерій, деяких патогенних бактерій та джерел вуглецевого живлення. Методом СДА оцінено - антагонізм лактобактерій щодо патогенної та умовно-патогенної мікрофлори, біосумісність штамів лактобактерій та проведено підбір джерел вуглецевого живлення. Отримані

результати практично стовідсотково співпадали з результатами отриманими традиційними мікробіологічними методами, що вказує на достовірність даних одержаних методом СДА та можливість його використання поряд із стандартними мікробіологічними методами для експрес оцінки пробіотичних властивостей мікроорганізмів. Тобто у певних випадках дослідження методом СДА можуть замінити вартісні та рутинні класичні мікробіологічні методи.

В роботі також показано, що метод СДА може бути використано для регулювання росту лактобактерій. При правильному підборі варіанту дії відповідних СДХ на біооб'єкт та часу експозиції (до 5хв) виявлена стимуляція росту культур лактобактерій, яка забезпечувала підвищення виходу біомаси до 14,2 разів. При цьому не виявлено суттєвих змін в морфологічних ознаках лактобактерій. При високому часі обробки відповідними СДХ (більше 5хв) відмічали пригнічення росту бактерій до 42-54%.

За допомогою методу СДА визначено високий потенційний біотерапевтичний ефект (ПБЕ) лактобактерій на всі органи та системи організму людини, дані про які записані у відповідних базах даних КМЕ: шлунково-кишковий тракт, отоларінгологічна, дихальна, стоматологічна, гінекологічна та опорно-рухова системи, онкологічне навантаження.

Отже, порівняння СДХ лактобактерій із СДХ різноманітних патологічних станів організму людини дозволяє судити про ПБЕ обраного штаму лактобактерії на той чи інший патологічний процес в організмі людини. Отримані дані, а також результати отримані нами раніше, які свідчать про індивідуальну сприйнятливості людиною лактобактерій [Горчаков и др., 2004], дозволяють припустити, що при індивідуальному підборі пробіотиків з використанням методу СДА їх позитивний вплив на організм людини буде більш вираженим.

#### **Дослідження пробіотичних властивостей композиції пробіотику на основі лактобактерій**

З розвитком новітніх технологій все частіше стає популярним створення комплексних біопрепаратів. Цей напрямок стає перспективним, оскільки, доповнюючи один одного і займаючи в кишечнику свої найсприятливіші ніші, витісняючи з них хвороботворні мікроорганізми, ці бактерії мають більш ефективну терапевтичну дію порівняно з монопрепаратами.

Композицію з штамів отримували шляхом комбінування в різних співвідношеннях дводобові культури лактобактерій, взяті за об'ємом з однаковим титром життєздатних клітин ( $1 \times 10^9$  кл/мл), що відповідає концентрації клітин в більшості комерційних пробіотиках.

При оцінці співвідношень штамів лактобактерій в композиції за головний критерій було обрано антагоністичну активність (рис.3).

Найкращі результати відносно антагоністичної активності було отримано для таких співвідношень лактобактерій: *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* LB86 ВКІМ-В-5788: *L. delbrueckii subsp. delbrueckii* DSM20074: *L. rhamnosus* LB3 ІМВ В-7038: *L. rhamnosus* V<sup>®</sup>: *L. acidophilus* (C) - 1:2:1:1:1 та 1:1:1:3:1.

Порівнюючи результати експериментальних досліджень антагоністичної активності композицій лактобактерій та окремих штамів, що входять до їх складу, щодо патогенної та умовно-патогенної мікрофлори слід зазначити, що антагоністична активність композицій була вищою ніж окремих штамів. Тобто в композиції штами підсилюють антагоністичні властивості один одного.

Для остаточного вибору композиції потенційного пробіотику перевірено здатність обраних композицій проявляти ПБЕ щодо різноманітних органів та систем організму людини методом СДА. Проаналізувавши отримані дані встановлено, що перше співвідношення штамів (1:2:1:1:1) має більш виражений ПБЕ, тому вирішено зупинитися саме на цій комбінації штамів для подальшої розробки пробіотику.

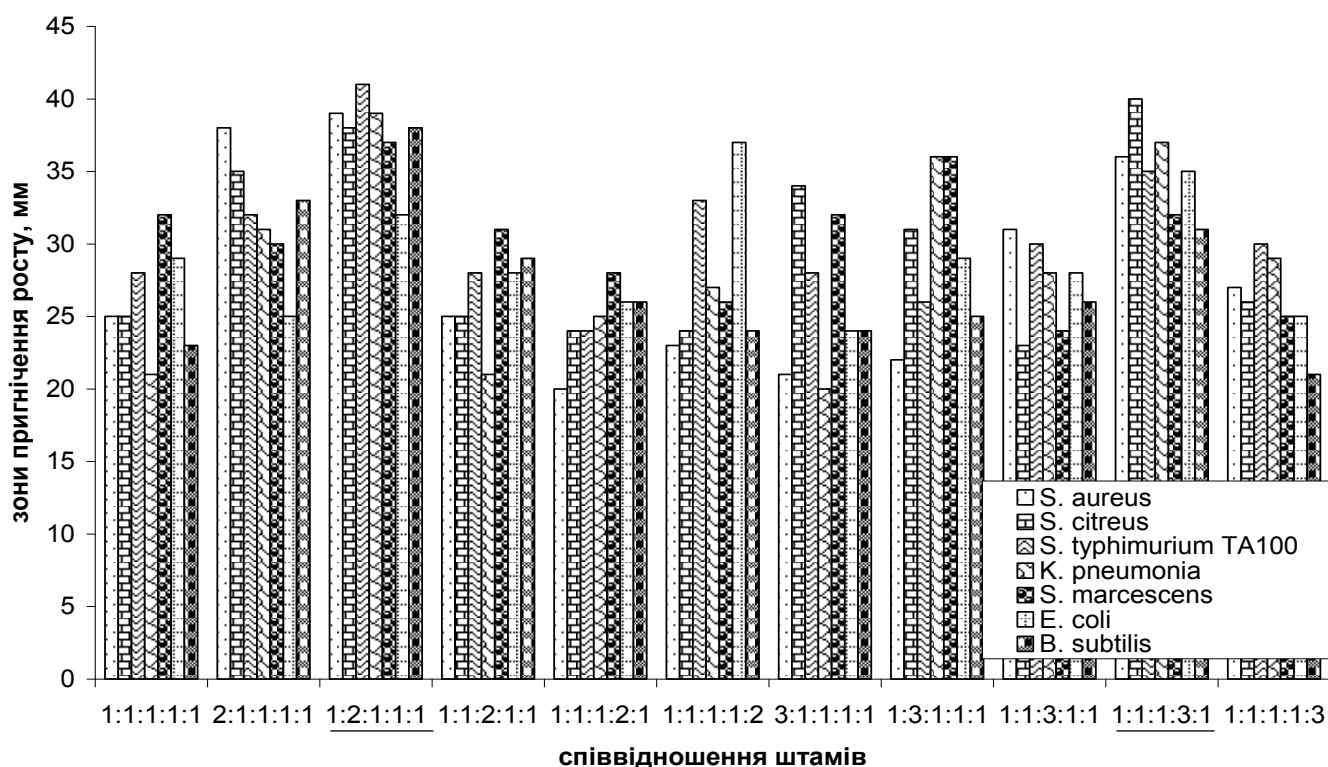


Рис.3. Антагоністична активність штамів *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* LB86 BKIM-B-5788, *L. delbrueckii subsp. delbrueckii* DSM20074, *L. rhamnosus* LB3 IMB B-7038, *L. rhamnosus* V<sup>®</sup>, *L. acidophilus* (C), взятих у різних співвідношеннях.

Обрана композиція лактобактерій мала високі ПБЕ щодо патологій ШКТ: жовчного міхуру, стравоходу, шлунку, печінки, тонкого кишечника, сліпої, прямої, порожньої, дванадцятипалої кишок, жовчовивідних протоків, підшлункової залози, тощо, та хвороб отоларінгологічної системи: гайморит, фронтит, синусит, патології глотки, слизової оболонки носа, підщелепної, привушної та під'язичної залоз, тощо. Композиція також мала достатню потенційну лікувальну ефективність при онкологічних навантаженнях, хворобах опорно-рухової (особливо при хворобах суглобів) та ендокринної систем, хворобах жіночої та чоловічої сечостатевої систем, офтальмологічних захворюваннях та хворобах серцево-судинної системи. Розроблена композиція також мала високі ПБЕ щодо пульманологічних хвороб: ринопневманії, бронхіальній астмі, патологіях гортані, бронхів, трахеї, легень, бронхіол, плеври, тощо. Перспективним напрямком застосування створеної композиції виявилися стоматологічні хвороби: періодонтит, пухлини ясен, везикулярний стоматит, гінгівіт, остити, пародонтоз, одонтоабсцес та зубний камінь.

Підібравши співвідношення штамів в композиції вважали за доцільне перевірити її основні пробіотичні властивості.

Оскільки, одним з можливих механізмів попередження колонізації патогенів є конкуренція за сайти адгезії на епітеліальних клітинах слизових перевірили адгезивні властивості розробленої композиції пробіотику. Показник адгезивності композиції штамів становив приблизно середнє значення адгезивностей усіх штамів, що входили до неї. За показником IAM отримана композиція відносилася до високоадгезивної (IAM=5,04-5,31).

Основною характеристикою пробіотику повинна бути нешкідливість по відношенню до організму пацієнта. Встановлено, що композиція лактобактерій в концентрації  $10^6$  кл/мл не токсична для моношару клітин тестикулів поросят ПТП, фібробластів мишей L-929 та спленоцитів.

Окрім захисту організму хазяїна від колонізації екзогенними патогенними мікроорганізмами та пригнічення росту вже існуючих в кишечнику патогенних мікроорганізмів нормальна мікрофлора макроорганізму взагалі та лактобактерії зокрема здатні реалізовувати імунологічні захисні реакції. Так, одноразове введення живих культур композиції лактобактерій викликало

суттєве зростання рівня ІФН в сироватці крові мишей. Максимум ІФН визначався на 6 год після введення препаратів і становив для композиції лактобактерій -  $3,7 \log_{20} \text{од/мл}$  ( $P < 0,05$ ) та для препарату порівняння Лактобактерину –  $3,9-4,0 \log_{20} \text{од/мл}$  ( $P < 0,05$ ), проти  $1,0 \log_{20} \text{од/мл}$  у контролі.

Щоденне введення дослідним тваринам, *per os* композиції або Лактобактерину протягом 5 діб дозволило підтримувати рівень циркулюючого ІФН відповідно до  $4,2 \pm 0,5$  та  $4,0 \pm 0,4 \log_{20} \text{од/мл}$  ( $P < 0,05$ ) проти  $2,0 \pm 0,3 \log_{20} \text{од/мл}$  в контролі.

Пероральне введення композиції лактобактерій та Лактобактерину в дозі 0,5 мл ( $1 \times 10^9$  кл/мл) приводило до утворення ендogenous ФНП. Так, Індекс цитотоксичності сироваткового ФНП для композиції сягав 0,7 нг/мл, для Лактобактерину - 0,9 нг/мл, у контролі 0,3 нг/мл ( $P < 0,05$ ).

Дослідження інтерферогенної активності даних культур в системі *in vitro* показало, що внесення дослідної композиції до МФПЕ інтактних мишей викликало синтез ІФН на рівні  $2,0 \log_{20} \text{од/мл}$ , проти  $1,0 \log_{20} \text{од/мл}$  у контролі.

Інкубування клітин МФПЕ інтактних мишей *in vitro* з культурами композиції та Лактобактерину в дозі  $1 \times 10^6$  кл/мл призводило до індукції ендogenous ФНП у незначній кількості - 1,1 та 1,0 нг/мл відповідно, проти 0,15 нг/мл у контролі.

Продукція ІФН під впливом композиції лактобактерій корелювала з підвищенням функціональної активності фагоцитуючих клітин. Проте підвищення рівня ІФН у циркуляції відмічали на 6 год, а підвищення поглинальної здатності фагоцитів - на 24 год спостереження. Введення дослідних препаратів супроводжувалось підсиленням функціональної активності МФПЕ мишей. Під впливом композиції лактобактерій поглинальна активність МФПЕ – фагоцитарне число сягало 57,5% ( $P < 0,05$ ) на 1, 3 та 5 добу спостереження, проти 54,2% у контролі. Показники фагоцитарного індексу залишались практично в межах контролю. Підсилення бактерицидної активності макрофагів за даними НСТ-теста не відмічали.

На відміну від системи *in vivo*, дослідження функціональної активності фагоцитуючих клітин в системі *in vitro* під впливом дослідних препаратів показало, що під дією композиції лактобактерій в концентраціях  $10^6$  та  $10^3$  кл/мл поглинальна активність МФПЕ підвищувалася з  $58,3 \pm 2,4$  % у контролі, до  $62,2 \pm 1,8$ % ( $P < 0,01$ ) та  $60,1 \pm 1,8$ % ( $P > 0,05$ ), відповідно. Фагоцитарний індекс підвищувався до  $7,8 \pm 2,3$  та  $7,0 \pm 2,5$  ум.од. ( $P > 0,05$ ), відповідно, порівняно з  $5,7 \pm 1,5$  ум.од. у контролі.

Досліджені препарати підсилювали *in vitro* здатність МФПЕ інтактних мишей до відновлення нітросинього тетразолію. Так, композиція лактобактерій та Лактобактерин в концентраціях  $10^6$  і  $10^3$  кл/мл підвищували кисень-залежну бактерицидну активність МФПЕ відповідно до:  $18,2 \pm 1,3$ %;  $16,3 \pm 1,2$ %, та  $18,2 \pm 1,2$ %;  $16,2 \pm 1,3$ % ( $P < 0,002$ ) проти  $12 \pm 1,3$ % у контролі.

Для дослідження впливу композиції лактобактерій на цитотоксичну активність ПКК спленоцити мишей (попередньо оброблені 0,826% розчином хлориду амонію для лізису еритроцитів) культивували з мішенями L-929 у співвідношенні 1:100 та вносили дослідні препарати в концентраціях  $10^3$  та  $10^6$  кл/мл, попередні досліди показали значну інтерферогенну активність таких доз препаратів. Індекс цитотоксичності для композиції та препарату порівняння Лактобактерину в концентраціях  $10^3$  та  $10^6$  кл/мл становив 35,2, 39,7% ( $P < 0,02$ ) та 40,7 і 39,2%, ( $P < 0,002$ ), відповідно, проти 31,6% у контролі.

В роботі використовували супернатанти, що були одержані при культивуванні макрофагів ( $1 \times 10^7$  кл/мл) та спленоцитів ( $1 \times 10^6$  кл/мл) з індукторами: вірус хвороби Ньюкаслу, фітогемаглютинін, композиція лактобактерій і Лактобактерин. В перші 24 год. інкубації спленоцитів або макрофагів з стандартними індукторами, а також з композицією лактобактерій і Лактобактерином не залежно від дози, отримані супернатанти, не виявляли стимуляції ПКК. При 48 годинній інкубації з індукторами встановлено достовірне підвищення природної кілерної активності спленоцитів. Встановлено, що внесення в тест-систему одержаних зразків призводило до підсилення цитотоксичної активності ПКК як дослідних, так і інтактних мишей.

Показавши наявність у розробленій композиції імуномодуючих властивостей цікаво було перевірити її здатність запобігати вірусним захворюванням. Визначення протівірусної активності композиції лактобактерій *in vivo* проводили на моделі експериментального герпетичного менінгоенцефаліту мишей. Композиційний препарат лактобактерій мав виражену профілактичну

дію в дозі  $1 \times 10^9$  кл/мишу, а також лікувальні властивості, оскільки ІЕ –30 та більше, є показником антигерпетичної активності *in vivo* (табл. 3). Шестиденний курс композиції лактобактерій дозволив на 20% попередити загибель тварин за профілактичною та на 33% за терапевтичною схемами застосування.

Таблиця 3

Протекторна дія дослідних препаратів при експериментальному герпетичному менінгоенцефаліті мишей

| Препарат                                | Доза,<br>кл/мишу  | Кількість<br>тварин | Летальність |      | КЗ   | ІЕ    |
|-----------------------------------------|-------------------|---------------------|-------------|------|------|-------|
|                                         |                   |                     | всього      | %    |      |       |
| Профілактична схема введення препаратів |                   |                     |             |      |      |       |
| Композиція лактобактерій                | 1x10 <sup>5</sup> | 10                  | 8           | 80   | 1,25 | 37,5  |
| Композиція лактобактерій                | 1x10 <sup>9</sup> | 10                  | 5           | 50   | 2,0  | 50,0  |
| Лактобактерин                           | 1x10 <sup>9</sup> | 10                  | 7           | 70   | 1,4  | 28,0  |
| Лікувальна схема введення препаратів    |                   |                     |             |      |      |       |
| Композиція лактобактерій                | 1x10 <sup>9</sup> | 12                  | 8           | 66,6 | 1,5  | 33,3  |
| Композиція лактобактерій                | 1x10 <sup>5</sup> | 10                  | 7           | 30,0 | 1,43 | 30,0  |
| Лактобактерин                           | 1x10 <sup>9</sup> | 12                  | 7           | 58,3 | 1,7  | 41,17 |
| плацебо                                 |                   | 10                  | 10          | 100  | -    | -     |

Примітка: КЗ - кратність захисту; ІЕ – індекс ефективності.

Враховуючи несприятливі екологічні умови, що склалися на території України після Чорнобильської трагедії та внаслідок техногенної діяльності, зросла потреба в препаратах, які здатні виводити з організму людини важкі метали та радіонукліди. Оскільки в багатьох роботах експериментально доведено, що бактерії, дріжджі, гриби та водорості здатні виводити іони важких металів та радіонуклідів з водних розчинів та ґрунтів в достатньо великих кількостях [Solozhenkin et al., 2003, Hadi et.al., 2003, Göksungur et al., 2003], то такими препаратами можуть стати пробіотики на основі бактерій – біосорбентів іонів важких металів.

Тому було досліджено здатність розробленого композиційного препарату сорбувати іони важких металів. Показано, що здатність лактобактерій сорбувати іони металів не залежала ні від стану клітин (живі, мертві), ні від часу експозиції їх з металами.

З таблиці 4 видно, що композиція лактобактерій мала найкращу сорбційну здатність та характеризувалася найвищим коефіцієнтом сорбції, ніж окремі штами.

Таблиця 4

Здатність лактобактерій сорбувати іони важких металів

| Штами лактобактерій                                      | Концентрація іонів важких металів в розчинах культивування |           |             |              |            |           |
|----------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------|-----------|-------------|--------------|------------|-----------|
|                                                          | 2 ГДК Pb                                                   |           | 2 ГДК Cu    |              | 2 ГДК Cd   |           |
|                                                          | СЗ                                                         | КС        | СЗ          | КС           | СЗ         | КС        |
| Композиція лактобактерій                                 | 27,67±1,22                                                 | 5,49±0,18 | 32,87±1,33  | 36,72±1,34   | 16,17±0,75 | 1,87±0,02 |
| <i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> LB86      | 46,50±1,38                                                 | 6,37±0,27 | 30,155±1,28 | 173,31±7,52  | 0,00       | 1,00±0,02 |
| <i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>delbrueckii</i> DSM20074 | 30,17±1,29                                                 | 4,48±0,15 | 19,54±0,88  | 74,74±3,64   | 0,00       | 1,00±0,02 |
| <i>L. acidophilus</i> (C)                                | 0,00                                                       | 1,00±0,02 | 20,245±0,97 | 225,94±10,21 | 14,67±0,59 | 1,96±0,05 |
| <i>L. rhamnosus</i> V®                                   | 0,00                                                       | 1,00±0,02 | 6,455±0,31  | 25,36±1,07   | 0,00       | 1,00±0,02 |
| <i>L. rhamnosus</i> LB3                                  | 0,00                                                       | 1,00±0,02 | 13,95±0,43  | 115,94±4,87  | 12,67±0,57 | 3,32±0,13 |
| <i>L. plantarum</i> (Лактобактерин)                      | 0,00                                                       | 1,00±0,02 | 3,00±0,09   | 3,96±0,16    | 0,00       | 1,00±0,02 |

Примітка: сорбційна здатність (СЗ) – відсоток адсорбованих іонів металу з розчину по відношенню до внесеної концентрації іонів металу до розчину; коефіцієнт сорбції (КС) –

відношення концентрації іонів металу, що адсорбували клітини до початкової концентрації іонів відповідного металу в клітинах (у %).

Слід зазначити, що штам порівняння - *L. plantarum* (Лактобактерин) майже не проявив здатності сорбувати іони важких металів. Різні штами лактобактерій відрізнялися за своїм сорбційним спектром. Так, штами *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* LB86 та *L. delbrueckii subsp. delbrueckii* DSM20074 мали достовірно високі сорбційні показники щодо іонів свинцю та міді, але зовсім не володіли здатністю сорбувати іони кадмію. Для штамів *L. acidophilus*(C) та *L. rhamnosus* LB3 навпаки спостерігалася здатність сорбувати іони міді та кадмію. Штами *L. plantarum* (Лактобактерин) та *L. rhamnosus* V<sup>®</sup> виявилися строго специфічними у своїй сорбційній здатності щодо іонів міді.

Оскільки лише композиція лактобактерій показала здатність до сорбції всіх взятих до дослідження іонів металів при їх концентрації 2ГДК, дослідження сорбційної здатності більш високих концентрацій іонів металів було продовжено саме на ній. Отримані результати показали, що максимальна сорбційна здатність композиції для іонів кадмію спостерігалася при його концентрації 20ГДК – 86%, натомість максимальний коефіцієнт сорбції досягався при 300ГДК і становив 99,4%.

Це вказує на можливість використання розробленої композиції як потенційного пробіотику із здатністю до біосорбції та виведенню іонів важких металів з організму людини.

Таким чином, розроблена композиція лактобактерій має вищу антагоністичну активність по відношенню до патогенної та умовно-патогенної мікрофлори, адгезивні властивості, антимутагенну активність, більш м'яку імуномодуючу активність ніж препарат порівняння Лактобактерин, а також на відміну від нього проявляє здатність до сорбції іонів важких металів.

## ВИСНОВКИ

На основі скринінгу штамів бактерій роду *Lactobacillus* за основними пробіотичними властивостями розроблено композицію поліштамового пробіотику.

1. Розроблена композиція містить 5 біосумісних штамів: *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* LB86 ВКІМ-В-5788; *L. delbrueckii subsp. delbrueckii* DSM20074; *L. rhamnosus* LB3 ІМВ В-7038; *L. rhamnosus* V<sup>®</sup>; *L. acidophilus* (C) – у співвідношенні 1:2:1:1:1 та проявляє високі антагоністичні та адгезивні властивості.

2. Відібрані штами характеризуються високими антимутагенними властивостями, які забезпечують пригнічення мутагенної дії модельного мутагену – азиду натрію на 58,43 – 99,03%, на відміну від референс-штаму, антимутагенна дія якого становить менше 60%.

3. Композиція лактобактерій має найширший спектр та найвищі показники сорбційної здатності щодо іонів  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$ , ніж окремі штами, що входять до її складу та штам порівняння *L. plantarum* (Лактобактерин).

4. Розроблена композиція в концентрації  $10^6$  кл/мл не проявляє токсичності до моношару клітин тестикулів поросят ПТП, фібробластів L-929 та спленоцитів мишей - *in vitro* та в досліді *in vivo*.

5. Композиція лактобактерій виступає потенційним індуктором цитокінів імунної відповіді I типу (ІФН та ФНП- $\alpha$ ), які здатні впливати на функціональну активність макрофагів перитонеального ексудату та цитотоксичність природних клітин кілерів (ПКК). Стимуляція фагоцитарної системи дослідною композицією корелює з підвищенням цитотоксичності ПКК та їх впливом на продукцію імунорегуляторних цитокінів (ІФН та ФНП- $\alpha$ ).

6. Створена композиція має профілактичну протигерпетичну дію, що показана на моделі герпетичного менінгоенцефаліту мишей в дозі  $1 \cdot 10^9$  кл/мишу, а також лікувальні властивості з індексом ефективності – 30. Шестиденний курс композиції лактобактерій дозволяє на 20% попередити загибель тварин за профілактичною та на 33 % за терапевтичною схемами застосування.

7. Розроблено методику одержання спектрально-динамічних характеристик (СДХ) біооб'єктів. Створено базу СДХ лактобактерій методом спектрально-динамічного аналізу (СДА). Показано тотожність результатів отриманих класичними мікробіологічними методами та методом СДА. Встановлено можливість регуляції (стимуляції/пригнічення) росту лактобактерій під впливом СДХ.

8. Методом СДА визначено потенційні напрямки застосування лактобактерій та композиції на їх основі для лікування захворювань різноманітних органів та систем організму людини.

### СПИСОК РОБІТ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Старовойтова С.О. Пробиотики- промотори життя ХХІ століття / С.О. Старовойтова, В.Ю. Горчаков // Наукові вісті НТУУ «КПІ».-2006.-№2.-С.104-114. (Здобувач провів літературний та патентний пошук, опрацював та систематизував отримані дані, підготував статтю до друку)
2. Старовойтова С.О. Вивчення факторів, які впливають на спектрально динамічні характеристики молочнокислих бактерій / С.О. Старовойтова // Наукові вісті НТУУ «КПІ».-2006.-№4.-С.145-149.
3. Старовойтова С.О. Скринінг штамів лактобактерій з метою розробки на їх основі ефективних мультипробиотиків / С.О. Старовойтова, В.Ю. Горчаков // Наукові вісті НТУУ «КПІ».-2006.-№5.-С.100-103. (Здобувачем особисто досліджено харчові потреби, спектр біотерапевтичної дії та біосумісність лактобактерій, проаналізовано отримані результати, підготовано статтю до друку)
4. Старовойтова С.О. Регуляція росту лактобактерій фізичними методами *in vitro* / С.О. Старовойтова, В.Ю. Горчаков // Наукові вісті НТУУ «КПІ».-2007.-№4.-С.106-114. (Здобувачем особисто проведено дослідження регуляції (стимуляції/пригнічення) росту лактобактерій фізичними методами, проаналізовано отримані результати, підготовано статтю до друку)
5. Старовойтова С.О. Гіпохолестеринемічна та протеолітична активність лактобактерій *in vitro* / С.О. Старовойтова, Л.Б. Орябінська, В.Ю. Горчаков // Довкілля та здоров'я.-2007.-№4 (43).-С.68-71. (Здобувачем особисто проведено дослідження гіпохолестеринемічної та протеолітичної активності лактобактерій, проаналізовано отримані результати, підготовано статтю до друку)
6. Старовойтова С.О. Інтерфероногенна активність лактобактерій / С.О. Старовойтова, Н.О. Тимошок, М.Я. Співак, В.Ю. Горчаков // Імунологія та алергологія.-2007.-№4.-С.24-27. (Здобувачем особисто підготовані зразки для проведення імунологічних досліджень, спільно з співавторами проведено дослідження інтерфероногенної активності лактобактерій, проаналізовано отримані результати, підготовано статтю до друку)
7. Старовойтова С.О. Молочнокислі бактерії – біосорбенти важких металів / С.О. Старовойтова, Л.Б. Орябінська, В.Ю. Горчаков // Наукові вісті НТУУ «КПІ».-2008.-№1.-С.108-116. (Здобувачем особисто підготовано зразки для вивчення мікроелементного складу лактобактерій та їх здатності сорбувати іони важких металів з розчинів, проаналізовано отримані результати, підготовано статтю до друку)
8. Горчаков В.Ю. Использование «Комплекса медицинского экспертного» в решении проблем эндэкологии человека / В.Ю. Горчаков, С.А. Старовойтова, Л.А. Горчакова, И.В. Оржельский, С.И. Кушнерчук, М.М. Переста, В.О. Постоев // Проблемы освіти: Наук.-метод. зб.-К., Інститут інноваційних технологій і змісту освіти, 2006.-Вип.49.-С.73-76.
9. Горчаков В.Ю. Индивидуальный подбор и использование пробиотиков для оздоровления молодежи Украины / В.Ю. Горчаков, Л.А. Горчакова, Р.Ф. Каминский, А.В. Сас, С.А. Старовойтова // Валеологія: сучасний стан, напрямки та перспективи розвитку / Матеріали IV науково-практичної конференції. 5-7 квітня 2006р.: У 2-х т. м. Харків:-2006.-Т.2.-С.61-63.
10. Старовойтова С.О. Вивчення спектру потенційних біотерапевтичних властивостей молочнокислих бактерій / С.О. Старовойтова, В.Ю. Горчаков // Валеологія: сучасний стан, напрямки та перспективи розвитку / Матеріали V науково-практичної конференції. 12-14 квітня 2007р.: У 2-х т. м. Харків:-2007.-Т.2.-С.206-217. (Здобувачем особисто проведено вивчення потенційної терапевтичної дії лактобактерій на різноманітні органи та системи організму людини методом СДА, проаналізовано отримані результати, підготовано статтю до друку)
11. Старовойтова С.О. Вивчення потенційних пробиотичних властивостей молочнокислих бактерій / С.О. Старовойтова, Л.Б. Орябінська, В.Ю. Горчаков // Сборник тезисов III Всеукраинской научно-практической конференции с международным участием «Биотехнология. Образование. Наука. Практика» (18-20 октября 2006г. г.Харьков).-Харьков, 2006.-С.112.
12. Старовойтова С.О. Генопротекторні властивості молочнокислих бактерій / С.О. Старовойтова, Л.Б. Орябінська, В.Ю. Горчаков, О.М. Дуган // Молодь та поступ біології: Збірник тез третьої Міжнародної наукової конференції студентів і аспірантів (23-27 квітня 2007року, м.Львів).-Львів, 2007.-С.368-369.

13. Старовойтова С.А. Антисканцерогенные свойства молочнокислых бактерий / С.А. Старовойтова, Л.Б. Орябинская, В.Ю. Горчаков, А.М. Дуган // Тези VIII конференції молодих онкологів з міжнародною участю «Сучасні проблеми експериментальної та клінічної онкології» (26-27 квітня 2007р., м. Київ).-К.:ДІА,2007.-С.74.
14. Старовойтова С.О. Терапевтичні властивості пробіотичних мікроорганізмів / С.О. Старовойтова, Л.Б. Орябінська // Збірка тез доповідей X Міжнародної науково-практичної конференції студентів, аспірантів та молодих вчених «Екологія. Людина. Суспільство» (16-21 травня 2007р. м. Київ).-К.:НТУУ «КПІ», 2007.-С.64.
15. Горчаков В.Ю. Перспективы создания пробиотиков целевого назначения / В.Ю. Горчаков, С.А. Старовойтова, Л.Н. Шинкаренко // Материалы Международного конгресса «Пробиотики, пребиотики, синбиотики и функциональные продукты питания. Фундаментальные и клинические аспекты» (15-16 мая 2007г. г. Санкт-Петербург) / Клиническое питание. Научно-практический журнал.-2007.-№1-2.-С.34.
16. Старовойтова С.О. Вплив асоціативної культури лактобактерій на герпетичний менінгоенцефаліт у мишей / С.О. Старовойтова, Н.О. Тимошок, М.Я. Співак// Научно-практическая конференция с международным участием «Инфекции в практике клинициста. Антибактериальная и антивирусная терапия на догоспитальном и госпитальном этапах» (27-28 марта 2008г., г. Харьков).- Харьков, 2008.-С. 316-317.
17. Старовойтова С.О. Імуномодулюючі та противірусні властивості композиції бактерій роду *Lactobacillus* / С.О. Старовойтова, Н.О. Тимошок // Молодь і поступ біології: Збірник тез IV Міжнародної наукової конференції студентів і аспірантів (7-10 квітня 2008року, м.Львів).-Львів, 2008.-С.340-341
18. Тимошок Н.А. Деякі аспекти імуномодулюючої дії пробіотичних препаратів / Н.А. Тимошок, В.С. Підгорський, Л.Н. Шинкаренко, Д.А. Сишел, С.О. Старовойтова, Н.Я. Співак // Матеріали Всеукраїнської навчально-наукової конференції «Довкілля і здоров'я» (24-25 квітня 2008року, м. Тернопіль).-Тернопіль, ТДМУ «Укрмедкнига» 2008.-С.87-88.
19. Старовойтова С.О. Пробиотичні властивості композиції нового поліштамового пробіотику / С.О. Старовойтова, Л.Б. Орябінська, С. Гармаш // II Науково-практична конференція студентів та аспірантів Дні Науки ФБТ НТУУ "КПІ" "Біотехнологія XXI століття" (23-25 квітня 2008 року, м.Київ).-Київ, 2008.-[http://www.biotech.ntu-kpi.kiev.ua/images/pic\\_to\\_article/Conf/Section\\_1.doc](http://www.biotech.ntu-kpi.kiev.ua/images/pic_to_article/Conf/Section_1.doc).
20. Старовойтова С.О. Сорбція іонів важких металів бактеріями роду *Lactobacillus* / С.О. Старовойтова, Л.Б. Орябінська // Збірка тез доповідей XI Міжнародної науково-практичної конференції студентів, аспірантів та молодих вчених «Екологія. Людина. Суспільство» (13-18 травня 2008р. м. Київ).-К.:НТУУ «КПІ», 2008.-С.40-41.
21. Старовойтова С.А. Создание пробиотиков нового поколения / С.А. Старовойтова, В.Ю. Горчаков, Л.Б. Орябинская, А.М. Дуган // Материалы V Международной научно-практической конференции «Актуальные вопросы и организационно-правовые основы сотрудничества Украины и КНР в сфере высоких технологий»-К.: КиевЦНТЭИ, 2008.-С.176-180.

## АНОТАЦІЯ

**Старовойтова С.О. Розробка композиції поліштамового пробіотику на основі бактерій роду *Lactobacillus*. -Рукопис.**

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.20 – біотехнологія.-Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К.Заболотного НАН України, Київ, 2008.

Розроблено композицію поліштамового пробіотику, до якої увійшли п'ять біосумісних штамів бактерій роду *Lactobacillus*: *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* LB86 ВКІІМ-В-5788, *L. delbrueckii subsp. delbrueckii* DSM20074, *L. rhamnosus* LB3 ІМВ В-7038, *L. rhamnosus* V<sup>®</sup>, *L. acidophilus* (C), у співвідношенні – 1:2:1:1:1.

Розроблено методику одержання спектрально-динамічних характеристик біооб'єктів для можливості реалізації методу спектрально-динамічного аналізу при експрес оцінці їх основних пробіотичних властивостей. Методом спектрально-динамічного аналізу вивчено потенційні біотерапевтичні ефекти лактобактерій та розробленої на їх основі композиції, що дало можливість



виявити перспективні напрямки застосування розробленої основи пробіотику. Показано можливість регуляції (стимуляції/пригнічення) росту лактобактерій методом спектрально-динамічного аналізу.

Створена композиція лактобактерій не проявила токсичності в дослідях *in vivo* та *in vitro*, а також характеризувалася вищою резистентністю до дії агресивних умов шлунково-кишкового тракту, адгезивністю, генопротекторною активністю, більш м'якою імуномодуючою дією ніж препарат порівняння Лактобактерин, а також на відміну від нього проявила здатність до сорбції іонів важких металів. Після проведення ряду відповідних досліджень розроблену композицію лактобактерій можна рекомендувати до використання в якості лікарського засобу для пробіотикопрофілактики та пробіотикотерапії населення України.

**Ключові слова:** лактобактерії, пробіотичні властивості, імуномодуючі властивості, антимутагенні властивості, пробіотик, біосорбенти.

## АННОТАЦІЯ

**Старовойтова С.А. Разработка композиции полиштаммового пробиотика на основе бактерий рода *Lactobacillus*. - Рукопись.**

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.20.-биотехнология.- Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины, Киев, 2008.

Диссертация посвящена разработке композиции полиштаммового пробиотика на основе бактерий рода *Lactobacillus*. Отобрано пять биосовместимых штаммов лактобактерий: *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* LB86 ВКПМ-B-5788, *L. delbrueckii* subsp. *delbrueckii* DSM2007, *L. rhamnosus* LB3 IMB B-7038, *L. rhamnosus* V<sup>®</sup>, *L. acidophilus* (C), которые проявили высокие пробиотические свойства (антагонизм по отношению к патогенной и условно-патогенной микрофлоре, кислотообразование, продукцию перекиси водорода и лизоцима, адгезивность, устойчивость к действию антибиотиков и агрессивных условий желудочно-кишечного тракта, отсутствие потенциальных мутагенных и наличие антимутагенных эффектов, гипохолестеринемическая и протеолитическая активности). Подобрано соотношение штаммов в композиционной культуре (1:2:1:1:1), которое обеспечило ей высокие антагонистические, адгезивные, иммуномодулирующие и противогерпетические свойства.

Изучение антагонистической активности разработанной композиции и штаммов, входящих в ее состав, относительно патогенной и условно-патогенной микрофлоры выявило, что штаммы, находясь в композиционной культуре, усиливают антагонистические активности друг друга.

Исследование адгезивной активности композиции лактобактерий на модели нативных и формализованных эритроцитов позволило отнести ее к высокоадгезивной с индексом адгезивности 5,04-5,31.

Разработанная композиция лактобактерий проявила себя потенциальным индуктором цитокинов иммунного ответа первого типа (интерферона и фактора некроза опухолей). Стимуляция фагоцитарной системы композицией лактобактерий коррелировала с повышением цитотоксической активности природных клеток киллеров и их влиянием на продукцию иммунорегуляторных цитокинов (интерферона и фактора некроза опухолей).

Композиция лактобактерий имела выраженное профилактическое действие при экспериментальном менингоэнцефалите мышей, а также проявляла лечебные свойства, поскольку индекс эффективности равный 30 и выше является показателем противогерпетической активности *in vivo*.

Созданная композиция лактобактерий проявила высокую сорбционную способность по отношению к ионам тяжелых металлов ( $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$ ), что может свидетельствовать о возможности пробиотиков на основе лактобактерий сорбировать и выводить ионы тяжелых металлов из организма человека.

Разработана методика получения спектрально-динамических характеристик биологических объектов для реализации метода спектрально-динамического анализа при экспресс оценке их основных пробиотических свойств. Методом спектрально-динамического анализа изучены потенциальные биотерапевтические эффекты лактобактерий и разработанной на их основе

композиции. Это дало возможность определить перспективные направления использования разработанной основы пробиотика в медицинской практике.

В работе также показано, что метод спектрально-динамического анализа может использоваться для регуляции роста лактобактерий. При правильном подборе варианта действия соответствующих спектрально-динамических характеристик биологических объектов и времени экспозиции (до 5 мин) выявлена стимуляция роста культур лактобактерий, которая обеспечивала увеличение выхода биомассы до 14,2 раз. При этом не выявлено значительных изменений в морфологических признаках лактобактерий. При относительно высоком времени обработки соответствующими спектрально-динамическими характеристиками (более 5 мин) отмечали угнетение роста бактерий до 42-54%.

Показано, что разработанная композиция лактобактерий не токсична для макроорганизма и имеет ряд преимуществ по сравнению с препаратом сравнения Лактобактерином. Она характеризуется более высокой устойчивостью к действию агрессивных условий желудочно-кишечного тракта, адгезивностью, генопротекторной активностью, более мягким иммуномодулирующим действием чем препарат сравнения, а также в отличие от него проявляет способность к сорбции ионов тяжелых металлов. После проведения ряда соответствующих исследований разработанную композицию лактобактерий можно будет рекомендовать для использования в качестве лекарственного средства для пробиотикопрофилактики и пробиотикотерапии.

**Ключевые слова:** лактобактерии, пробиотические свойства, иммуномодулирующие свойства, антимутагенные свойства, пробиотик, биосорбенты.

## ABSTRACT

**Starovoitova S.A. Development of the composition of the polystrain probiotic on basis of the bacteria of genus *Lactobacillus*.-Manuscript.**

Thesis for the candidate's degree by speciality 03.00.20.-biotechnology.-Zabolotny Institute of Microbiology and Virology of National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, 2008.

Composition of polystrain probiotic was developed, which contain five strains of bacteria of the genus *Lactobacillus*: *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* LB86 BKIM-B-5788, *L. delbrueckii* subsp. *delbrueckii* DSM20074, *L. rhamnosus* LB3 IMB B-7038, *L. rhamnosus* V<sup>®</sup>, *L. acidophilus* (C) in correlation – 1:2:1:1:1.

Method of taking of spectral-dynamic characteristics of bioobjects for realization method of spectral-dynamic analyzes for express assessment their main probiotic properties was developed. Potential biotherapeutic effects of the lactic acid bacteria and developed composition of them by spectral-dynamic analysis were studied. This study gave a possibility to find out perspective fields of using developed composition of probiotic. Possibility of regulation (stimulation/suppression) of growth of the lactic acid bacteria by method of spectral-dynamic analyze.

The developed composition of lactic acid bacteria was not toxic in *in vivo* and *in vitro* experiments and had higher stability for influence of aggressive condition of gastrointestinal tract, adhesion, antimutagenic activity and milder immunomodulation activity than Lactobacterin, and also unlike it shows a capacity for sorption of ions of heavy metals. After conducting of row of proper researches the developed composition of lactic acid bacteria can be recommended for the use as medication for the prevention and therapy the population of Ukraine.

**Key words:** lactobacteria, probiotic properties, immunomodulation properties, antimutagenic properties, probiotic, biosorbents.