



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **93132** (13) **C2**
(51) **МПК (2011.01)**
C12N 1/20
C12R 1/23 (2006.01)
A61K 35/74 (2006.01)

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(54) ШТАМ LACTOBACILLUS ACIDOPHILUS IMB B-7279 - ІНДУКТОР ЕНДОГЕННОГО ІНТЕРФЕРОНУ І ТИПУ

1

2

(21) a200906962

(22) 03.07.2009

(24) 10.01.2011

(46) 10.01.2011, Бюл.№ 1, 2011 р.

(72) СПІВАК МИКОЛА ЯКОВИЧ, ПІДГОРСЬКИЙ ВАЛЕНТИН СТЕПАНОВИЧ, ШИНКАРЕНКО ЛЮБОВ МИКОЛАЇВНА, ГОРЧАКОВ ВОЛОДИМИР ЮРІЄВИЧ, СТАРОВОЙТОВА СВІТЛАНА ОЛЕКСАНДРІВНА, ЛАЗАРЕНКО ЛЮДМИЛА МИКОЛАЇВНА, ТИМОШОК НАТАЛІЯ ОЛЕКСАНДРІВНА

(73) ІНСТИТУТ МІКРОБІОЛОГІЇ І ВІРУСОЛОГІЇ ІМ. Д.К. ЗАБОЛТНОГО НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ НАУК УКРАЇНИ

(56) RU C1 2176668, 10.12.2001.

Clancy R L et al.: "Reversal in fatigued athletes of a defect in interferon ? secretion after administration of Lactobacillus acidophilus", Br J Sport Med 2006 40: 351-354.

Akiko Torii et al.: "Lactobacillus acidophilus strain L-92 regulated the production of Th1 cytokine as well as Th2 cytokines", Allergology International. 2007; 56: 293-301.

Ishida Y. et al.: "Clinacal effects of Lactobacillus acidophilus strain L-92 on perennial allergic rhinitis: A double-blind, placebo-controlled study", J Dairy Sci. 88:527-533.

Старовойтова С.О. та інш.: "Імуномодулюючі властивості бактерій роду Lactobacillus", ISSN 0201-8462. Мікробіол. Журн., 2009, Т. 71, №3. JP A 2004091491, 25.03.2004.

Nikolaeva TN et al.: "The effects of the microbial component of the probiotic Acilant on the cell-mediated immunity factors under experimental conditions", Vestn. Akad. Med. Nauk SSSR (ISSN: 0869-6047) [2005; Volume: (Issue: 12)] page info: 40-6. (ABSTRACT).

Kitazawa H et al.: "Interferon induction in murine peritoneal macrophage by stimulation with Lactobacillus acidophilus", Microbiol. Immunol. (ISSN: 0385-5600) (ESSN: 1348-0421) [1992; Volume: 36 (Issue: 3)] Page info: 311-5 (ABSTRACT).

(57) Штам Lactobacillus acidophilus IMB B-7279 - індуктор ендогенного інтерферону I типу.

Винахід відноситься до біотехнологічної промисловості, а саме до одержання нового штаму лактобактерій, який має інтерфероногенні властивості.

Використання пробіотиків, створених на основі індигенної мікрофлори шлунково-кишкового тракту, зокрема лактобактерій є перспективним напрямком цілеспрямованої імунорекції. Відомо, що пробіотики впливають на фактори природженого та набутого імунітету у процесі розвитку імунної відповіді. Важливим механізмом їх дії є зміна продукції цілої низки імунорегуляторних цитокінів, насамперед інтерферонів, які відповідають за формування клітинної ланки імунітету, а, отже, і за ефективність розвитку імунної відповіді при інфекційних, онкологічних захворюваннях тощо. Система інтерферону має важливу контрольну-регуляторну функцію у збереженні гомеостазу ор-

ганізму, оскільки інтерферонам притаманна протівірусна, імуномодулювальна, протизапальна, антибактеріальна та антрипроліферативна активності. Тому пошук нових штамів лактобактерій, які будуть впливати на продукцію інтерферону для створення нових високоефективних пробіотичних препаратів є актуальною проблемою.

Запропонований штам Lactobacillus acidophilus IMB B-7279 - впливає на продукцію ендогенного інтерферону I типу в організмі експериментальних тварин, виділений самостійно в лабораторних умовах з асоційованої культури під час лабораторних досліджень ферментованого біологічного матеріалу, знаходиться в колекції живих культур Інституту мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України.

На Україні потреби у штамів лактобактерій із інтерфероногенними властивостями задовольня-

(13) **C2**

(11) **93132**

(19) **UA**

ються переважно за рахунок штамів закордонного походження. Найбільш близьким до винаходу за результатами інтерферогенної активності є штами *Lactobacillus acidophilus* NCFM® (Danisco, Данія) [1], *Lactobacillus acidophilus* L-92 (Gifu, Японія) [2, 3], *Lactobacillus acidophilus* X37 (Frederiksberg, Данія) [4], *Lactobacillus acidophilus* LAFTf L-10 (NSW, Австралія) [5], які індукують продукцію інтерферону II типу. Проте, на відміну від перерахованих штамів під впливом запропонованого нами штаму *Lactobacillus acidophilus* IMB B-7279 індукується продукція інтерферону I типу. Аналогів за проявами таких властивостей серед штамів *Lactobacillus acidophilus* нами не виявлено.

Культурально-морфологічні властивості. Грампозитивні, факультативно анаеробні, нерухливі палички, які не утворюють спор. Ростають на середовищі MPC при 38,0±1,0 °C. Штам вирощують протягом 18-24 год.

Склад середовища MPC:

пептон	10 г/л,
м'ясна вода	100 мл,
дріжджовий екстракт	10 г/л,
глюкоза	20 г/л,
K ₂ HPO ₄	2 г/л,
CH ₃ COONa	5 г/л,
амоній лимоннокислий	2 г/л,
MgSO ₄	0,2 г/л,
MnSO ₄	0,05 г/л,
твин-80	1 мл,
вода дистильована	до 1 л.

pH стерилізації дорівнює 6,6-6,8 (після стерилізації - 6,2-6,6). Для отримання більш щільного середовища MPC додають 2 % агару. Можливо вирощувати штам на середовищі без твину-80.

Модифіковане середовище MPC: в 200 мл дистильованої води розчиняють 0,05 г MnSO₄, 0,2 г MgSO₄, 0,2 г цистеїну, 2 г K₂HPO₄, 2 г цитрату амонію, 5 г CH₃COONa, 20 г глюкози, 10 г пептону. Додають також 1 мл твину-80 (попередньо розчиняють окремо в невеликій кількості гарячої дистильованої води), 50 мл дріжджового автолізу, по 100 мл екстракту печінки та м'ясного екстракту. Об'єм рідини доводять дистильованою водою до 500 мл та додають 500 мл гідролізованого молока, pH дорівнює 6,2-6,8. Середовище фільтрують та стерилізують.

Фізіолого-біохімічні властивості. Штам не росте в аеробних умовах, зберігає життєздатність на середовищах з широким діапазоном pH - від 2,5 до 8,5, але оптимальним є значення, яке дорівнює 5,5-6,5. Зберігає життєздатність на середовищі в присутності холестерину, жовчі, шлункового соку, травних ферментів та фенолу. Ферментує глюкозу без утворення вуглекислого газу. В рідкому середовищі MRS з 2% глюкози накопичує молочну кислоту, не утворює етанол. Також має здатність до ферментування фруктози, целобіози, галактози, лактози, мальтози, манози, рамнози, рибози, сахарози, трегалози, глюконату натрію, саліцину. Слабко ферментує рафінозу та мелібіозу, однак не ферментує манітол, крохмаль, ксилозу.

Штам нетоксичний, непатогенний, авірулентний.

Штам є генетично однорідним, не піддавався мутагенним впливам та генетичним модифікаціям. Відношення до кисню: факультативний анаероб.

Відношення до температури: оптимальна температура для росту 38,0±1,0°C.

Довготривале зберігання (2 роки і більше) в сублімованому стані в запаяних ампулах. Захисне середовище під час ліофільного висушування: сахароза 10%, желатин 1%, pH 7,0±0,2.

Інтерферогенні властивості.

Введення мишам живих клітин штаму призводить до стимуляції ендогенного інтерферогенезу. Суттєве накопичення інтерферону у сироватці крові під впливом штаму спостерігається уже через 6 год: титри інтерферону підвищуються з 5,30±0,90 log₂ Од/мл у контролі відповідно до 7,00±0,01 Од/мл (P<0,05). Високий рівень сироваткового інтерферону виявляється на 1 (8,00±0,01 log₂ Од/мл), 3 (9,00±0,05 log₂ Од/мл) та 6 (9,00±0,01 log₂ Од/мл) добу. У мишей, які отримували штам, концентрація цього цитокіну у сироватці крові виявилась підвищеною і на 12 добу (7,00±0,02 log₂ Од/мл). Після введення мишам штаму зростає спонтанна продукція інтерферону клітинами селезінки *in vitro*. На 1 добу титри інтерферону підвищуються до 7,00±0,04 log₂ Од/мл проти 5,00±0,01 log₂ Од/мл (P<0,05) у контролі. Проте на 3, 6 та 12 добу вони вірогідно не відрізняються від показників контролю (відповідно 7,00±0,01; 6,00±0,02 та 4,00±0,02 log₂ Од/мл). Штам підвищує здатність спленоцитів до продукції інтерферону-α *in vitro*. Після введення штаму на 1 добу спостерігається тенденція до підвищення титрів інтерферону-α у супернатантах активованих спленоцитів (6,00±0,16 log₂ Од/мл; у контролі 5,00±0,01 log₂ Од/мл; P>0,05), тоді як на 3 добу вони зростають суттєво - до 8,00±0,23 log₂ Од/мл проти 6,00±0,01 log₂ Од/мл (P<0,05) у контролі. На 6 та 12 добу титри інтерферону-α зменшуються до рівня контрольних показників (відповідно до 5,00±0,09 та 4,00±0,06 log₂ Од/мл). Отже, запропонований штам виявився ефективним індуктором інтерферону I типу. Перевагою запропонованого штаму є його здатність індукувати інтерферон I типу у високих титрах.

Антагоністична активність. Запропонований штам має антагоністичну активність відносно музейних та клінічних штамів деяких бактерій. Так, під його впливом спостерігається затримка росту музейних штамів: *Staphylococcus aureus* B-918, *Staphylococcus aureus* B-917, *Staphylococcus aureus* 209-P, *Staphylococcus aureus* 43, *Staphylococcus aureus* 8325, *Staphylococcus aureus* spp., *Staphylococcus epidermidis* B-919, *Enterococcus faecalis* B-915, *Escherichia coli* B-915, *Klebsiella pneumoniae* B-920, *Pseudomonas aeruginosa* B-900, *Candida albicans* Y-1918. Запропонований штам мав антагоністичну дію відносно таких клінічних штамів: *Staphylococcus epidermidis* 38, *Staphylococcus epidermidis* 14, *Staphylococcus aureus* Q394, *Pseudomonas aeruginosa* Q351, *Escherichia coli* 5921, *Enterococcus faecalis* 347, *Klebsiella oxytoca*, *Candida albicans* 1763.

Таким чином, запропонований штам *Lactobacillus acidophilus* IMB B-7279 рекомендується

ся використовувати для отримання харчових добавок та створення медичних препаратів з інтерферогенними властивостями, а також для лікувально-профілактичних препаратів медичного та ветеринарного призначення.

Література

1. Lactobacillus acidophilus NCFM® - a probiotic with proven efficacy // TM-54-Ie. Danisco.
2. Y. Ishida, F. Nakamura, H. Kanzato, D. Sawada, H. Hirata, A. Nishimura, O. Kajimoto, S. Fujiwara Clinical effects of Lactobacillus acidophilus strain L-92 on perennial allergic rhinitis: a double-blind, placebo-controlled study // J. Dairy Sci. - 2005. - 88. - p. 527-533.
3. A. Torii, S. Torii, S. Fujiwara, H. Tanaka, N. Inagaki, H. Nagai Lactobacillus acidophilus strain L-

92 regulates the production of Th1 cytokine as well as Th2 cytokines // Allergology International. - 2007. - 56. - p. 293-301.

4. Zeuthen L.H., Christensen H.R., Frokiar Lactic acid bacteria inducing a weak Interleukin-12 and Tumor Necrosis Factor alpha response in human dendritic cells inhibit strongly stimulating lactic acid bacteria but act synergistically with gram-negative bacteria // Clinical and Vaccine Immunology. - 2006. - Mar. - p. 365-375.

5. Clancy R.L., Gleeson M., Cox A., Callister R., Dorrington M., D'Este C., Pang G., Pyne D., Fricker P., Henriksson A. Reversal in fatigued athletes of a defect in interferon γ secretion after administration of Lactobacillus acidophilus // Br. J. Sports Med. - 2006. - 40. - p. 351-354.