



УДК 615.451.1:579.864

О. Г. Вольська, Л. М. Шинкаренко, Т. С. Тодосійчук,
І. С. Зарицька, Д. Д. Заболотна

ВИБІР НАПОВНЮВАЧІВ ДЛЯ ГОТОВИХ ЛІКАРСЬКИХ ФОРМ ПРЕПАРАТІВ НА ОСНОВІ СЕЛЕКЦІОНОВАНИХ ШТАМІВ ЛАКТОБАЦИЛ

Інститут отоларингології ім. проф. О. С. Коломійченка АМН України, Київ

Ефективність використання біотерапевтичних препаратів (БТП) сьогодні доведена і дає позитивні результати в різних галузях медицини. Біотерапевтичні препарати на основі мікробних культур усувають негативні ефекти, що виникають при застосуванні антибіотичних препаратів, і дисбіотичні порушення в макроорганізмі та сприяють відновленню автохтонної мікрофлори. Через це збільшуються й потреби в біотерапевтичних препаратах, висуваються підвищені вимоги щодо їхньої якості та складу.

Механізм дії БТП обумовлений здатністю лактобактерій виживати як у кислому, так і в лужному середовищі, ефективно адгезуватися на епітелії слизової оболонки та колонізувати її, продукувати антимікробні, антибіотикоподібні природні речовини, стимулювати імунну систему, пригнічувати ріст і розвиток умовно-патогенної флори. Дію БТП на основі лактобацил на організм людини взагалі важко переоцінити, сьогодні вони є найперспективнішими для лікування запальних захворювань. Нашим колективом розроблено комплекс біотерапевтичних препаратів на основі двох селекціо-

нованих штамів *Lactobacillus rhamnosus LB3* та *Lactobacillus murinus LE* для використання в отоларингології. Препарати використовують для лікування хворих на хронічний тонзиліт та гаймороеетмоїдит. Ефективність застосування вітчизняних БТП обумовлена тим, що вони створені на основі бактерій, які є представниками нормальної флори людини, виділені на території України, біологічно близькі та сумісні з лактобацилами — представниками нормальної мікрофлори макроорганізму.

Стабілізація лактобактерій у препараті з метою збільшення термінів збереження та якості препаратів — важлива технологічна стадія при розробці та виробництві препаратів, що визначає термін їх використання. Основний та найпоширеніший спосіб висушування — ліофільна сушка. Але для стабілізації самих клітин до складу препарату слід вводити речовини, які підтримують та підвищують основні терапевтичні функції лактобактерій. З огляду на літературні дані (яких, на жаль, дуже мало), як стабілізатори використовуються органічні та неорганічні речовини [1–3]. Для стабілізації пробіотичних пре-

паратів досить часто використовують цукри (наприклад лактозу) [4].

Матеріали та методи дослідження

Об'єктами дослідження були штами молочнокислих бактерій роду *Lactobacillus*: *Lactobacillus rhamnosus LB3* та *Lactobacillus murinus LE*, які досліджували на можливість використання як основи для створення пробіотичних препаратів для отоларингології.

Штами виділені та селекціоновані на кафедрі промислової біотехнології факультету біотехнології і біотехніки НТУУ «КПІ», депоновані в депозитарії Інституту мікробіології і вірусології НАН України під № IBM B-7038 (*Lactobacillus rhamnosus LB3*) та № IBM B-7037 (*Lactobacillus murinus LE*).

Були використані такі варіанти захисних середовищ:

1. Глюкоза — 2 %, декстран — 0,5 %; середовище використовувалося для культур *Lactobacillus rhamnosus LB3*, *Lactobacillus murinus LE* та їх суміші.

2. Глюкоза — 2 %, поліетиленгліколь — 2 %. Для культури *Lactobacillus rhamnosus*.

3. Глюкоза — 9 %, желатин — 1 %. Для культури *Lactobacillus rhamnosus*.



4. Сахароза — 9 %, желатин — 1 %. Середовище використовувалося для культур *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus murinus* та їх суміші.

Препарати на основі лактобацил: «Лактолор» (*Lactobacillus murinus* — найменування LE) має об'єм 1 мл, кількість клітин — $5 \cdot 10^9$ кл/мл; «Ацидолор» (*Lactobacillus rhamnosus* — найменування LB3) має об'єм 1 мл, кількість клітин — $5 \cdot 10^9$ кл/мл; «Ацидолак» (*Lactobacillus murinus* та *Lactobacillus rhamnosus*) — об'єм 1 мл, кількість клітин обох культур — по $5 \cdot 10^9$ кл/мл, яка дорівнює $1 \cdot 10^{10}$ кл/мл на флакон.

Ліофільне висушування проводили на установці УЗВ-10 (конструкція в модифікації Інституту мікробіології і вірусології) в такому режимі:

— початкова температура на полиці з матеріалом -20 °C, кінцева температура $+25$ °C;

— початкова температура в десубліматорі -50 °C;

— тривалість висушування 30–40 год.

Метод визначення антагоністичної активності досліджуваних культур

Для вивчення антагоністичних властивостей досліджуваних препаратів використовували модифіковану методику визначення бактерицидної та бактериостатичної дії, що складалася з таких етапів:

1. Розливали по 2 мл рідкого живильного середовища (бульйон MPC) у стерильні пробірки, в першу наливали 4 мл.

2. Після цього в пробірках готували серію розведень препарату: в пробірку з 4 мл живильного середовища MPC вносили 1 стандартну дозу препарату, потім з цієї пробірки переносили 2 мл суспензії в наступну пробірку і т. д. Таким чином, кожне наступне розведення препарату було в 2 рази меншим за попереднє.

3. Окремо готували суспензії добових тест-культур.

Робили суспензії концентрацією 10^9 кл/мл за стандартом каламутності ПСК ім. Л. О. Тарасевича на фізіологічному розчині. В другу пробірку наливали 9,9 мл фізіологічного розчину, вносили туди 0,1 мл суспензії 10^9 кл/мл і отримували суспензію з густиною 10^7 кл/мл.

4. Вносили в усі пробірки з розведеннями препарату по 0,1 мл суспензії тест-культур (10^7 кл/мл) та залишали на 24 год у термостаті для одночасного культивування разом з контрольними, що не містили препарату.

Після інкубації з усіх пробірок висівали по 0,1 мл суспензії на відповідні щільні живильні середовища. Вміст умовно-патогенної флори визначали підрахунком кількості колоній, що вирости. Концентрація препарату, при якій виростало не більше 10 колоній тест-культур, розглядалась як мінімальна бактерицидна або бактериостатична концентрація (загибель 99,9 % клітин тест-культури).

Тест-культури

В роботі використовували мікроорганізми тест-культури, виділені від хворих на хронічний тонзиліт та гайморитомідит: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans*.

Живильні середовища

Штам *Lactobacillus rhamnosus* LB3 вирощували при $37-38$ °C 24–48 год на рідкому та щільному агаризованому середовищі MPC (середовище Де Мана та співробітників) [5] такого складу (г/л): дріжджовий екстракт — 10; м'ясна вода — 100 мл; пептон — 10; глюкоза — 20; лимоннокислий амоній — 2,0; оцтовокислий натрій — 5,0; K_2HPO_4 — 2,0; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ — 0,2; $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ — 0,05; вода дистильована — 1 л, рН до стерилізації 6,6–6,8 (після стерилізації — 6,2–6,6). Для

отримання напіврідкого середовища додавали 0,5 % агару, для щільного — 2 % агару.

Середовище Сабуро для дріжджеподібних грибів мало склад (г/л): 10,0 пептону; 40,0 глюкози; вода — до 1 л, для отримання щільного середовища додавали 18 г агару. Середовище Ендо (для виділення грамнегативних бактерій) мало склад (г/л): 26,5 живильного агару; 0,22 фуксину; 10,7 молочного цукру; 0,48 динатрію фосфату; 0,83 сульфату натрію; 0,3 натрію вуглекислого. М'ясопептонний агар (МПА): 21 г живильного агару на 1 л дистильованої води. М'ясопептонний бульйон (МПБ) — виробництво НПО «Живильні середовища» (Махачкала). Кров'яний агар: готували МПА і додавали 10 мл крові.

Результати дослідження та їх обговорення

Антагоністичний вплив препаратів із різними варіантами захисних середовищ на основі клітин *Lactobacillus rhamnosus* LB3 по відношенню до умовно-патогенних мікроорганізмів виявлявся найповніше з четвертим варіантом наповнювача захисного середовища. Препарат, у складі якого були глюкоза 2 % та декстран 0,5 %, проявляв антагоністичну дію тільки проти *E. coli*, по відношенню до інших тест-культур антагонізму лактобактерій не було. Препарати, які містили другий і третій варіанти наповнювачів захисних середовищ, проявляли активність тільки до *S. aureus* та *E. coli*, до інших культур антагонізму не зафіксовано (табл. 1). Це свідчить про те, що на антагоністичну активність лактобактерій у лікарській формі суттєво впливає захисне середовище для сублімаційного висушування, яке має підтримувати життєздатність лактобактерій і зберігати концентрацію клітин у препараті. Однією з можливих причин втрати активності культури може бути те, що поліети-



Вплив наповнювача захисного середовища на вияв антагоністичної активності препарату на основі *Lactobacillus rhamnosus* LB3

Варіанти захисних середовищ	1	2	3	4
	Розведення препарату з бактерицидною дією			
Тест-культура				
<i>Staphylococcus aureus</i>	—*	1:2	1:8	1:32
<i>Escherichia coli</i>	1:1	1:4	1:8	1:32
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	—	—	—	1:32
<i>Enterobacter cloacae</i>	—	—	—	1:64
<i>Candida spp.</i>	—	—	—	1:32

Примітка. В табл. 1–3: * — бактерицидної дії по відношенню до вказаних тест-культур із зазначеним захисним середовищем не спостерігалось.

Таблиця 2

Вплив наповнювача захисного середовища на вияв антагоністичної активності препарату на основі *Lactobacillus murinus* LE

Варіанти захисних середовищ	1	2	3	4
	Розведення препарату з бактерицидною дією			
Тест-культура				
<i>Staphylococcus aureus</i>	—*	1:2	1:8	1:32
<i>Escherichia coli</i>	1:1	1:4	1:8	1:32
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	—	—	—	1:32
<i>Enterobacter cloacae</i>	—	1:2	—	1:64
<i>Candida spp.</i>	—	—	—	1:32

Таблиця 3

Вплив наповнювача захисного середовища на вияв антагоністичної активності препарату на основі *Lactobacillus rhamnosus* LB3 та *Lactobacillus murinus* LE

Варіанти захисних середовищ	1	2	3	4
	Розведення препарату з бактерицидною дією			
Тест-культура				
<i>Staphylococcus aureus</i>	—*	1:2	1:8	1:32
<i>Escherichia coli</i>	1:1	1:4	1:8	1:32
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	—	—	—	1:64
<i>Enterobacter cloacae</i>	—	—	—	1:64
<i>Candida spp.</i>	—	—	—	1:32

ленгліколь адсорбує клітини лактобацил, знижуючи їх кількість у препараті. Також при ліофільному висушуванні клітини надмірно зневоднюються, що є фактором їхньої загибелі. Як захисне середовище для препарату на основі штаму LB3 можна запропонувати, виходячи з досліду, сахарозо-желатинний наповнювач.

Препарат на основі селекціонованого штаму LE виявляв найбільшу антагоністичну активність по відношенню до наведених тест-культур у складі захисного середовища з сахарозою 10%-ю та желатином 1%-м (табл. 2). З іншими варіантами наповнювачів антагоністична здатність цього штаму втрачалася або виявлялася не повністю. Отже, спостерігається тенденція, як з препаратом на основі *Lactobacillus rhamnosus* LB3. Варіант наповнювача з декстраном є більш складним живильним субстратом, що призводить до гальмування розвитку лактобактерій при вживанні препарату. Желатин є ініціатором розвитку лактобацил, тому спостерігалось підвищення активності по відношенню до *S. aureus* та *E. coli*, бактерицидна концентрація $0,625 \cdot 10^9$ кл/мл.

Препарат на основі двох штамів лактобацил *Lactobacillus rhamnosus* LB3 та *Lactobacillus murinus* LE не відрізнявся від монопрепаратів лактобацил щодо збереження антагоністичної здатності на 100 % по відношенню до умовно-патогенних мікроорганізмів у складі четвертого варіанта захисного середовища (табл. 3). Наповнювач із сахарозою та желатином, можливо, підтримує активність лактобацил за рахунок того, що є поживним компонентом і використовується культурами на перших етапах застосування препарату. Перші три варіанти стабілізаторів пригнічують антагоністичні властивості препарату на основі двох селекціонованих штамів LE та LB3. Цей факт

може бути пов'язаний із втраченою життєздатністю культур, що зумовлює зменшення концентрації культур лактобацил у препараті.

Препарати на основі селекціонованих штамів лактобацил після сублімаційного висушування з четвертим варіантом захисного середовища (сахароза, желатин) зберігали

високу антагоністичну активність по відношенню до патогенних мікроорганізмів, збудників запальних захворювань верхніх дихальних шляхів (ВДШ). Сублімаційне висушування не пригнічувало здатності лактобацил продукувати молочну кислоту та інші органічні кислоти, які знижують рівень рН до значень, при яких



більшість мікроорганізмів не спроможні вижити, а також на здатність культури утворювати антибіотикоподібні речовини.

Висновки

Вивчення впливу різних варіантів захисних середовищ на антагоністичні властивості селекціонованих штамів лактобацил у складі лікарських засобів для отоларингології по відношенню до умовно-патогенних мікроорганізмів дозволяє пропонувати як наповнювач для ліофільного висушування при виробництві пробіотичних препаратів МРС з 10%-ю сахарозою та 1%-м желатином. Цей

наповнювач не знижує антагоністичні властивості культур лактобацил після сублімаційного висушування, а також не впливає на здатність утворювати антибіотикоподібні субстанції. В подальших дослідженнях використовуватимуться препарати із застосуванням вказаного варіанта захисного середовища на основі *Lactobacillus rhamnosus* LB3, *Lactobacillus murinus* LE та їх суміші.

ЛІТЕРАТУРА

1. Нечисляев В. А., Вдовина Г. П., Лучнин В. С. Разработка способов стабилизации биомассы при изготовлении лекарственных форм лак-

тобактерина // Журн. микробиологии. — 1998. — № 2. — С. 102-104.

2. Халенева М. П. Эффективность разных способов накопления и обезвоживания биомассы в производстве таблетированного бифидумбактерина: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. — М., 1985.

3. Бубнов Н. В., Питерская Г. П., Овечкин Н. П. // Биотехнология. — 1985. — № 3. — С. 80-82.

4. Белявская В. А., Ромашева Н. Г., Сорокулова И. Б. Разработка технологии получения таблеточной формы препарата субалин // Биотехнология. — 2001. — № 2. — С. 64-69.

5. Квасников Е. И., Несторенко О. А. Молочнокислые бактерии и пути их использования. — М.: Наука, 1975. — 384 с.

УДК 615.275.4.015.4.

Б. М. Галкін, М. Я. Головенко, І. Є. Барінова, В. Є. Осетров, Т. О. Філіпова

КОРЕКЦІЯ АНТИОКСИДАНТАМИ АКТИВНОСТІ СУПЕРОКСИДДИСМУТАЗИ І КАТАЛАЗИ В УМОВАХ ОКИСНЮВАЛЬНОГО СТРЕСУ

Одеський національний університет ім. І. І. Мечникова

Негативний антропогенний вплив на навколишнє середовище останніми десятиліттями спричинив створення низки вітчизняних і міжнародних програм. Один із найважливіших напрямків цих досліджень — вивчення принципів корекції адаптаційних механізмів людини при дії несприятливих факторів середовища.

До найнебезпечніших забруднювачів навколишнього середовища можна віднести окисли азоту і вуглецю — як продукти господарської діяльності, так і наслідки хімічних катастроф.

Високі концентрації окислів азоту спричиняють в організмі послідовні трифазні зміни: гострий бронхіт, набряк легень, бронхоспастичне облітерування. Навіть при невеликих дозах вони викликають леге-

невий фіброз і знижують активність легневих макрофагів, що призводить до зниження резистентності організму до вірусних і бактеріальних інфекцій [1].

Чадний газ, проникаючи через дихальні шляхи, проходить через альвеолярно-капілярні мембрани, розчиняється в плазмі крові і фіксує Hb з утворенням HbCO. Це знижує здатність крові переносити кисень, що призводить до гіпоксії тканин і, за інтенсивного впливу, може закінчитися летально.

Гострі отруєння чадним газом і діоксидом азоту супроводжуються порушенням тканинних процесів, пов'язаних з утилізацією кисню. Ці порушення строго специфічні, однією зі складових цих змін є окиснювальний стрес [2; 3].

До ферментативних компонентів біоантиоксидантного комплексу належать супероксиддисмутаза (СОД) і каталаза. Обидва ферменти каталізують реакції знешкодження активних форм кисню, тобто сильних окисників. Субстратом СОД є активна форма кисню, так званий супероксиданіон, що під дією ферменту перетворюється на менш сильний окисник — перекис водню. Він є субстратом іншого ферменту — каталази, що відновлює перекис до води. Таким чином, відбувається пряме знешкодження активних форм кисню, що запобігає ушкодженню ними тканин організму [4].

Еномеланін і пектин — відомі антиоксиданти. Їхня захисна дія при ураженнях СО і NO₂ вивчена, але в літературі

