

А.И. Мельник¹, И.В. Орловская¹, Н.М. Жолобак², Н.Я. Спивак²

¹ АТЗТ "ДиаПроф-Мед", ул. Светлицкого, 35^б, Киев, 04123, Украина

² Институт микробиологии и вирусологии им. акад. Д.К. Заболотного НАН Украины, ул. Академика Заболотного, 154, Киев, 03143, Украина

ПОЛУЧЕНИЕ ОЧИЩЕННОГО РЕКОМБИНАНТНОГО α_{2b} – ИНТЕРФЕРОНА ЧЕЛОВЕКА

Технология получения биологически активного рекомбинантного α_{2b} -интерферона основана на создании бактериального штамма-продуцента, содержащего кДНК-интерферона альфа человека. Нами получены два продуцента рекомбинантного α_{2b} -интерферона, синтез целевого белка в которых происходит в тельцах включения. Разработаны схемы выделения и очистки биологически активного рекомбинантного α_{2b} -интерферона. Чистота препарата составила около 97-98 %. Биологическая активность на культуре чувствительных клеток в цитопатическом тесте составила $2-4 \cdot 10^8$ МЕ/мл.

Ключевые слова: штамм-продуцент, тельца включения, рекомбинантный белок α_{2b} -интерферон, анионо- и катионообменная, гель-фильтрационная хроматографии, рефолдинг.

Повышение чистоты фармакологических субстанций, полученных с использованием ДНК технологий, остается актуальной задачей для биотехнологии. Наиболее экономически выгодным является использование штаммов-продуцентов, в которых уровень биосинтеза целевого белка составляет более 10 % от суммарных клеточных белков. Создание подобных бактериальных штаммов возможно при соблюдении ряда условий, один из которых – стабильность мРНК при экспрессии целевого гена.

При суперсинтезе гетерологичных белков в клетках *E.coli*, бактериальные клетки находятся в состоянии стресса, и во многих случаях бактериальная культура практически не растет после индукции синтеза целевого белка. Кроме того, накапливающиеся в клетках рекомбинантные белки могут иметь нежелательные модификации, начиная с неотщепленного N-концевого метионина [1], и заканчивая ацелированием или окислением некоторых аминокислотных остатков в белках. Подобные модифицированные белки могут не отделяться от целевого белка при его очистке с помощью различных видов хроматографии. Было замечено, что количество и характер подобных примесей в препаратах рекомбинантных белков зависит от условий ферментации штамма-продуцента, а не только от условий выделения и очистки целевого продукта [2].

Целью нашей работы была разработка технологии очистки субстанции рекомбинантного α_{2b} -интерферона (ИФН) из тельц включения для дальнейшего практического применения субстанции при создании медицинских и ветеринарных препаратов. Для решения данной задачи были созданы два штамма-продуцента, несущие в своем составе различные векторные системы для синтеза рекомбинантного α_{2b} -ИФН. Схемы получения целевого белка из обоих штаммов-продуцентов сравнивали с целью выявления наиболее оптимальной технологии очистки и выхода биологически активного белка.

Материалы и методы. Штаммы. В работе использовались бактериальные штаммы *Escherichia coli* **BL21(DE3)** В F⁻ dcm ompT hsdS(r_B-m_B-) gal λ(DE3), и *Escherichia coli* **BL21(DE3) CodonPlus-RIL** (F⁻ ompT hsdS(r_B-m_B-) dcm gal λ(DE3) endA Hte [argU ileY leuW Cam^r]).

Плазмиды. Рекомбинантная плаزمида рТТКм содержит вставку полноразмерного гена лейкоцитарного α_{2b} -интерферона человека и ген Кап (аминогликозид фосфотрансфераза). Синтез целевого гена регулируется триптофановым промотором. Плазмида рЕТ24 была создана на основе экспрессирующего вектора рЕТ24а ("Novagen"), транскрипция структурного гена в котором регулируется промотором lac-оперона. Рекомбинантная плазмида рЕТ24, содержит ген Кап и последовательность, кодирующую Т7 терминатор транскрипции.

Получение компетентных клеток и их трансформация. Компетентные клетки получали по стандартной методике с использованием CaCl₂ [6]. Клетки, трансформированные соответственно рекомбинантными плазмидами рТТКм и рЕТ24, высевали газонем на чашки Петри с агаризованной средой LB, которая содержала необходимые антибиотики канамицин и хлорамфеникол в конечной концентрации 50 мкг/мл и 34 мкг/мл, соответственно. Изолиро-

ванные клоны-трансформанты использовали для получения инокулята, который выращивали при температуре 30°C в течение 16-18 ч.

Среды для культивирования и условия культивирования. Для продуцента *E. coli* BL-IFN/pТТКм состав питательной среды и условия культивирования были выбраны ранее [3]. Штамм-продуцент *E. coli* BLR-IFN/pЕТ24 выращивали на питательных средах LB (0,5 % дрожжевого экстракта, Merck, 1,5 % триптонной воды, Merck, 0,5 % г NaCl, Merck), ТВ (10 % дрожжевой экстракт, Merck, 10 % пептон, Merck, 5 мМ глицерин, Merck, 72 мМ K_2HPO_4 , Merck, 17 мМ KH_2PO_4 , Merck) №3 (10 % дрожжевого экстракта, Merck, 10 % гидролизат казеина, Merck, 5 мМ глицерин, 1 мМ $MgSO_4$, 90 мкМ $CaCl_2$), аминокептид (Самсон-Мед, Россия). Синтез гена рекомбинантного α_{2b} -ИФН индуцировали разными концентрациями изопропил- β -D-тиогалактопиранозид (ИПТГ) от 0,1 мМ до 1 мМ. Посевной материал в соотношении 1:50 вносили в свежую питательную среду LB с соответствующими антибиотиками. Рост бактерий контролировали путем измерения оптической плотности клеток на спектрофотометре Ultrospec 2000 (Pharmacia Biotech). В качестве химического индуктора механизма биосинтеза рекомбинантного белка в культуральную среду добавляли индуктор – изопропил- β -D-тиогалактопиранозид (ИПТГ, Merck) к конечной концентрации 1 мМ. Ферментацию проводили при температуре 37 °С. Время накопления биомассы и целевого белка составило около 4 часов в условиях интенсивной аэрации при перемешивании (220 об/мин). Изучали динамику роста бактериальной культуры методом измерения оптической плотности отобранных аликвот на протяжении всего культивирования через каждый час. По завершению процесса ферментации клеточную биомассу собирали центрифугированием при 11000 об/мин. в течение 15 минут.

Лизис биомассы и отмывка телец включений. Лизис клеток продуцентов BL-IFN/pТТКм и BLR-IFN/pЕТ24 проводили обработкой лизоцимом и ДНК-азой в присутствии ионов Mg^{2+} . Тельца включения собирали центрифугированием при 11000 об/мин. в течение 25 минут на центрифуге JOUAN KR22i.

Схемы очистки телец включения рекомбинантного α_{2b} -ИФН из разных продуцентов BL-IFN/pТТКм и BLR-IFN/pЕТ24 имели отличия. Тельца включения α_{2b} -ИФН/pТТКм обрабатывали серией отмывочных растворов, имеющие в своем составе: детергенты (тритон X-100, твин-20), мочевины и изопропанол. Растворение телец включения проводили в растворе – 6 М гуанидин, 10 мМ дитиотреитол, 20 мМ Трис-НCl, pH-8,0. Для телец включения α_{2b} -ИФН/pЕТ24а была разработана схема очистки отмывочными растворами, содержащими: детергент (дезоксихолат натрия), ЭДТА. Раствор для растворения телец включения содержал 8 М мочевины, 20 мМ Трис-НCl, pH-8,0, 10 мМ ДТТ, 1 мМ ЭДТА. Рефолдинг проводили в буфере следующего состава: 20 мМ Трис- НCl, pH-8,0, 70 мМ NaCl, 0,1 % Тритон X-100, 0,1 % твин-20, 5 мМ ДТТ.

Электрофорез. Электрофоретический анализ биомасс и белков проводили в 15 % полиакриламидном геле (ПААГ) в денатурирующих условиях в присутствии 1 % SDS [7]. Сканирование окрашенных полиакриламидных гелей и расчет относительного содержания целевого белка определяли при помощи программного обеспечения GelScan Standart V5.

Ренатурация. Ренатурацию проводили на магнитной мешалке в течение 16-ти часов при температуре +4°C. Концентрированный раствор телец включения α_{2b} -ИФН/pТТКм разводили в 50 раз буфером следующего состава: 20 мМ Трис- НCl, pH-8,0, 70 мМ NaCl, 0,1 % Тритон X-100, 0,1 % твин-20. Раствор центрифугировали. В качестве рабочей фракции использовали надосадок. Для рефолдинга раствор α_{2b} -ИФН/pЕТ24 разбавляли в 50 раз в буфере следующего состава: 20 мМ Трис- НCl, pH-8,0, 70 мМ NaCl, 0,1 % Тритон X-100, 0,1 % твин-20, 5 мМ ДТТ.

Хроматографическая очистка. Хроматографическую очистку ИФН осуществляли в три стадии. Полученный ренатурированный ИФН на первом этапе подвергали очистке с помощью сорбента CM – Toyopearl-650M. На второй стадии хроматографической очистки раствор ИФН наносили на сорбент ДЭАЭ – Toyopearl-650M. Очистку мономерной формы ИФН от остатков полимерных форм ИФН проводили гель-фильтрацией на смоле типа TSK-гель «Toyopearl» HW-55 (ToyoSoda, Япония).

Контроль активности полученных субстанций. Антивирусную активность очищенного рекомбинантного α_{2b} -ИФН оценивали по угнетению цитопатического действия (ЦПД)

тест-вируса – вируса везикулярного стоматита (ВВС, штамм Индиана, Депозитарий Института микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины).

В 96-лунковые планшеты со сформированным монослоем клеток L929 вносили последовательные двукратные разведения образцов и международного стандарта ИФН человека (WHO IS Interferon alpha 2b, human rDNA derived, NIBSC code: 95/566). Через 24 часа клетки инфицировали ВВС в дозе 100 ТЦД₅₀, оставляя лунки для контроля вируса (необработанные клетки, инфицированные ВВС) и для контроля клеток (необработанные клетки, неинфицированные ВВС). Планшеты культивировали при 37°C в течение 24 час в насыщенной Н₂О атмосфере с постоянным уровнем СО₂ (5%). Полученные результаты принимали во внимание только при условии, если в контрольных лунках цитодеструктивные изменения отсутствовали, а в контроле вируса наблюдали полную деструкцию клеток.

Учет количества живых клеток проводили после их окраски кристаллическим фиолетовым. Для этого из лунок удаляли надосадочную жидкость, а к клеткам на 15 мин вносили 0,2 % раствор красителя Crystal Violet («Sigma», США) в 2 % этаноле. Краситель удаляли, а окрашенный монослой клеток промывали водой. Оптическую плотность окрашенных клеток измеряли на спектрофотометре с вертикальным лучом Multiskan Ascent («Thermo Labsystems», Финляндия) при длине волны 540 нм.

Титром ИФН считали значение, обратное максимальному разведению образца, обеспечивающему защиту 50 % клеток от ЦПД вируса. Титр ИФН выражали в log₂ (разведения)⁻¹, количественно биологическую активность определяли, сравнивая активность исследуемого раствора и международного стандарта ИФН. Определение активности ИФН в образцах проводили трижды [4].

Результаты и их обсуждение. Для клонирования гена альфа ИФН использовали систему на основе векторов рЕТ [8]. Эффективная экспрессия наших клонированных генов не оказывала негативного влияния на внутриклеточный метаболизм бактерии, однако, продукты экспрессии были токсичны. Поэтому, задача оптимизации при культивировании сводилась к тому, чтобы максимально репрессировать транскрипцию целевого гена до этапа накопления бактериальной биомассы [9]. За счет предварительно предусмотренных эффективных элементов, влияющих на трансляцию мРНК и ее стабильность в клетке, была индуцирована транскрипция, что в конечном итоге завершалось образованием целевого белка в количествах, достаточных для его выделения и дальнейшего практического применения. Такое использование экспрессионных систем приводило к тому, что на этапе биосинтеза белкового продукта целевого гена рост клеток и ее центральный метаболизм оказывались полностью подавленными. Т.о. в течение нескольких последних часов культивирования клетка расходовала накопленный в ней материальный и энергетический потенциал на производство рекомбинантного белка, уровень образования которого достигал 10-30 % от всех белков бактериальной клетки за 4 часа после индукции системы экспрессии (рис. 2).

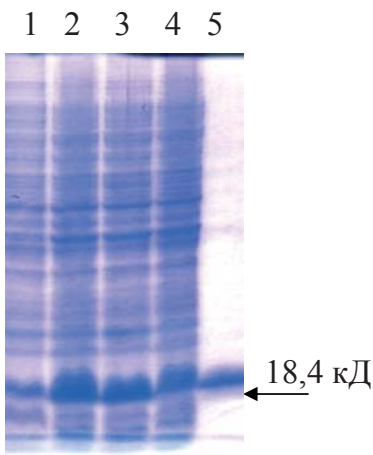


Рис. 1. Электрофореграмма образцов биомассы продуцента рекомбинантного α_{2b} -интерферона на разных средах. 1 – на среде LB; 2 – на среде ТВ; 3 – на среде №3; 4 – аминокислоты; 5 – контроль.

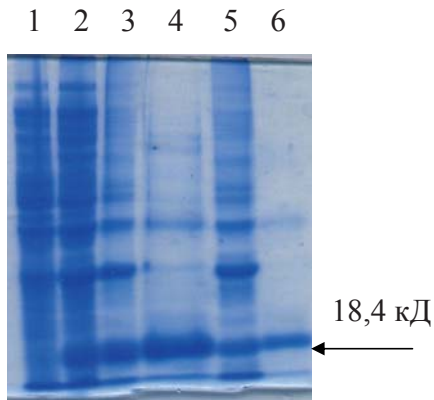


Рис. 2. Электрофореграмма образцов препаратов рекомбинантного α_{2b} -ИФН на разных этапах технологии получения.

- 1 – биомасса продуцента рекомбинантного α_{2b} -ИФН до индукции;
- 2 – биомасса продуцента рекомбинантного α_{2b} -ИФН после индукции;
- 3 – очищенные тельца включения;
- 4 – ренатурированный α_{2b} -ИФН в надосадке;
- 5 – фракция осадочных белков после ренатурации;
- 6 – очищенный α_{2b} -ИФН.

Для использования в работе рекомбинантных белков поиск штамма-реципиента являлся определяющим фактором, поскольку влиял на антивирусные свойства ИФН, который оценивали по результатам цитопатического теста. Нами отобран штамм-реципиент RIL (штамм-продуцент назван BLR-IFN/pET24). Культура BLR-IFN/pET24 была высеяна на жидкие питательные среды LB, ТВ, 2YT и среда №3, с целью выбора среды для культивирования. Высевная культура BLR-IFN/pET24 на разных средах была стандартизирована по оптической плотности для корректного сравнения параметров роста бактериальных клеток с оценкой продуктивности по целевому белку. В процессе подбора оптимальных условий культивирования для продуцента BLR-IFN/pET24 по данным электрофореза было определено, что наиболее высоким является выход целевого белка на среде ТВ, чем на средах LB, среде №3 и среде содержащей аминокислоты (рис. 1). Оптимальная концентрация химического индуктора для синтеза гена рекомбинантного альфа-2в-ИФН – 0,5мМ раствора ИПТГ. Синтез целевого белка достиг наибольшего уровня через четыре часа ферментации.

Известно, что продукция целевых белков в экспрессирующих системах BL-IFN/pТТКм и BLR-IFN/pET24 происходит в виде телец включения [3]. Тельца включения α_{2b} -ИФН/pТТКм относятся к труднорастворимым. Для получения их в растворимом виде использовали высокие концентрации мочевины и гуанидина. В растворе с 8 М мочевиной тельца включения растворялись с низким выходом, а в растворе с 6 М гуанидин гидрохлоридом растворялись с концентрацией 29 мг/мл. Как видно из электрофореграммы (рис. 2) в растворе с 6 М гуанидин гидрохлоридом, содержание целевого белка больше в несколько раз по сравнению с растворенным рекомбинантным α_{2b} -ИФН/pТТКм в 8 мочеvine. Выход телец включения с 1 г биомассы составил около 40 мг.

Бактериальные суперпродуценты позволяют получать значительные количества рекомбинантных белков. При этом чаще всего для биосинтеза целевых белков используются штаммы-продуценты *E.coli*, так как культивировать прокариотические микроорганизмы дешевле по сравнению с эукариотическими клетками. Однако процесс ферментации продуцента сопряжен с загрязнением целевого белка. Поэтому все примеси необходимо удалять до предельно допустимых значений.

Процедура выделения и хроматографической очистки рекомбинантного белка из штамма-продуцента BLR-IFN/pET24 включала разрушение бактериальных клеток методом лизиса, отмывки телец включений (ТВ), ренатурацию, анионообменные и гель-хроматографии. В литературе описаны схемы хроматографической очистки рекомбинантного α_{2b} -ИФН только в ренатурированном состоянии. В результате проведенных предварительных экспериментов выяснили, что тельца включения рекомбинантного α_{2b} -ИФН, растворенные в 8 М мочеvine или гуанидине гидрохлориде не связываются со многими ионообменными сорбентами.

Разработанная схема рефолдинга представляет собой снижение содержания гуанидина гидрохлорида до 0,12 М путем разведения и введения детергентов (третон X-100 и твин-20) для стабилизации белка в растворе. Данная схема оказалась оптимальной, так как в результате рефолдинга, чистота препарата целевого белка составила около 50 % с выходом активного ренатурированного белка около 60 %. Биологическая активность в цитопатическом тесте на культуре клеток тестикул поросенка при воздействии вируса везикулярного стоматита показала $2 \cdot 10^7$ ME/мг.

На первом этапе хроматографической очистки рекомбинантного α_{2b} -ИФН использовали катионообменник CM-toyopearl 550M. Элюцию белка с сорбента совершали в градиенте хлорида натрия от 0 до 1 М при pH 5,1. Выход целевого белка составил около 75 % от исходного. Для подготовки к хроматографической очистки на DEAE-toyopearl 550M, фракцию, содержащую ИФН диализовали против раствора 20 мМ трис-HCl и 1 мМ EDTA, pH 8,0 в течение 24 часов. Второй этап очистки проводили на анионообменнике DEAE-toyopearl 550M. Элюцию белка проводили в градиенте хлорида натрия от 0 до 0,3 М. Третью хроматографическую очистку снова проводили на CM-toyopearl 550-M при pH 4,0. Раствор белка перед нанесением развели в 4 раза раствором, содержащим 25 мМ ацетата аммония, и титровали до значения pH 4,0 раствором уксусной кислоты. Элюцию белка совершали в градиенте хлорида натрия от 0 до 0,2 М при pH 5,1. Как заключительный этап очистки применили метод гель-фильтрации на сорбенте HW-55 (рис. 3). Препарат ИФН предварительно был сконцентрирован в ПЕГ 3000. В результате всех стадий очистки нами была получена субстанция ИФН с чистотой более 97 % по данным электрофореза в ПААГ в восстанавливающих и не восстанавливающих условиях. Электрофореграмма очищенных препаратов ИФН представлена на (рис. 4).

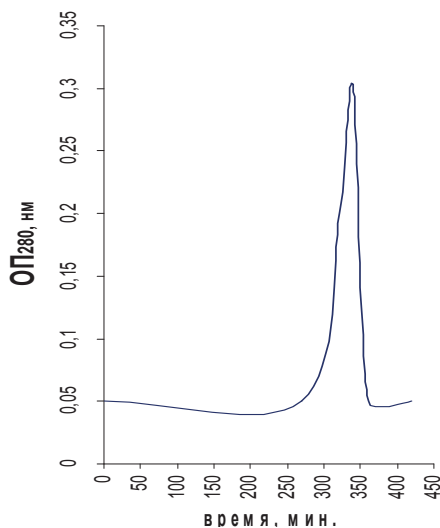


Рис. 3. Хроматограмма очищенного рекомбинантного α_{2b} -ИФН на сорбенте HW-55.

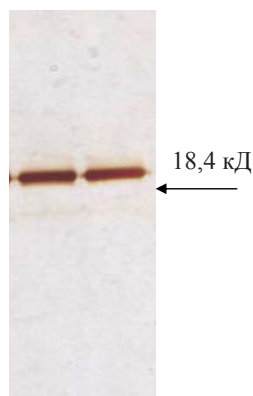


Рис. 4 Электрофореграмма очищенного рекомбинантного α_{2b} -ИФН (окрашивание серебром).

Разработанная технология очистки позволила получить из 1 г биомассы около 6,5 мг белка с чистотой более 97 %. Качественные показатели и эффективность очистки полученного α_{2b} -ИФН исследованы в цитопатическом тесте. Биологическая активность составила $2-4 \cdot 10^8$ МЕ/мг белка.

Сравнение условий культивирования штаммов продуцентов BL-IFN/pTTKм и BLR-IFN/pET24 показало, что в конце культивирования уровни экспрессии целевого белка на двух штаммах-продуцентах не отличались между собой. Но при культивировании штамма BL-

IFN/рТТКм, который выращивали в течение 23 часов, экспрессируется еще дополнительный белок (30-35 кД), неизвестный по своим функциям, и его полоса на электрофореграммах не уступала мажорной полосе рекомбинантного α_{2b} -ИФН. Так как известно из литературы, что α_{2b} -ИФН может образовывать полимерные формы, вследствие наличия четырех остатков цистеина, (Cys-1-Cys-98 и Cys-29-Cys-138), то экспрессированный белок с молекулярным весом 30-35 кД предположительно может быть димером [5]. Данный белок выделили и определили его биологическую активность в цитопатическом тесте. Биологической активностью он не обладал. При культивировании штамма продуцента BLR-IFN/рЕТ24 появление белка с молекулярной массой 30-35 кД не наблюдали, поэтому все усилия по разработке очистки α_{2b} -ИФН были сосредоточены на штамме продуцента BLR-IFN/рЕТ24. В результате разработанной технологии, чистота полученной субстанции рекомбинантного α_{2b} -ИФН составила 97 %.

Работа выполнена при поддержке научного проекта «Разработка, создание и испытание композитных нанобиоматериалов на основе наночастиц диоксида церия» ДЗ/492-2011 Государственным агентством по вопросам науки, инноваций и информатизации Украины.

А.І. Мельник¹, І.В. Орловська¹, Н.М. Жолобак², М.Я. Спивак²

¹ АТЗТ "ДіаПроф-Мед", вул. Світлицького, 35^б, Київ, 04123, Україна

² Інститут мікробіології і вірусології НАН України ім. акад. Д.К. Заболотного, вул. Академіка Заболотного, 154, Київ, 03143, Україна

ОТРИМАННЯ ОЧИЩЕНОГО РЕКОМБІНАНТНОГО α_{2b} – ІНТЕРФЕРОНУ ЛЮДИНИ

Резюме

Технологія отримання біологічно активного рекомбінантного α_{2b} -інтерферону ґрунтується на створенні бактеріального штаму-продуцента, що містить кДНК-інтерферону альфа людини. Нами отримано два продуцента рекомбінантного α_{2b} -інтерферону, у яких синтез цільового білка відбувається в тільцях включення. Розроблені схеми виділення та очистки біологічно активного рекомбінантного α_{2b} -інтерферону. Чистота препарату складає близько 97-98 %. Біологічна активність отриманого інтерферону в культурі чутливих клітин в цитопатичному тесті склала $2\text{-}4 \cdot 10^8$ МЕ/мг.

Ключові слова: штам-продуцент, тільця включення, рекомбінантний білок α_{2b} -інтерферон, аніоно- катіонообмінна, гель-фільтраційна хроматографія, рефолдінг.

A.I. Melnik¹, I.V. Orlovska¹, N.M. Zholobak², M.Ya. Spivak²

¹ CSC DiaProf-Med, Kyiv

²Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv

PRODUCTION OF PURIFIED HUMAN RECOMBINANT α_{2b} -INTERFERON

Summary

Technology for producing biologically active recombinant α_{2b} -interferon is based on creating a bacterial producer strain containing the cDNA of human interferon alpha. The authors have obtained two producers of recombinant α_{2b} -interferon, the synthesis of the target protein in them occurs in the inclusion bodies. The schemes of isolation and purification of biologically active recombinant α_{2b} -interferon have been developed. The drug purity was approximately 97-98%. Biological activity in the culture of sensory cells in the cytopathic test was $4.2 \cdot 10^8$ ME/mg.

The paper is presented in Russian.

Key words: producer strain, inclusion bodies, recombinant α_{2b} -interferon protein, anion- and cation-exchange, gel-filtration chromatography, refolding.

The authors' address: Melnik A.I., CSC DiaProf-Med, 35^b Svetlitsky St., Kyiv, 04123, Ukraine

1. Глик Б., Пастернак Дж. Молекулярная биотехнология. Принципы и применение. – М.: Мир, 2002. – С. 38-41.
2. Биофармацевтический журнал. – 2010. – 2, №1. – С. 14-19.
3. Орловська І.В., Грабченко Н.І., Спивак М.Я. Оптимізація умов культивування штамів *Escherichia coli*-продуцентів рекомбінантного альфа-2b-інтерферону. // Мікробіол. журн. – 2007. – 69, №2. – С. 50-55.
4. Лазаренко Л.Н., Спивак Н.Я., Михайленко О.М., Сухих Г.Т. Лакатош В.П. Титрование интерферона. – В кн.: Папилломавирусная инфекция и система интерферона. – К.: Фитосоцицентр, 2008. – С. 237-238.

5. Петренко В.А., Татков С.И. Структурно-функциональная организация лейкоцитарного интерферона // Молекулярная биология. – 1990. – 24, Вып.6. – С. 1495-1504.
6. Sambrook J., Russell D. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. – Cold Spring Harbour Laboratory Press, 2001. – P.2344.
7. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage – T4. // Nature. – 1970. – 227. – P.680-685.
8. pET System Manual 11th edition. – Merck; Germany, 2004.
9. Baneyx Fr. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*. // Current Opinion in Biotechnology – 1999. – 10. – P.411-421.

Отримано 17.05.2011

UDC 579.864.1:615.331

**S.A. Starovoitova^{1,2}, L.P. Babenko¹, N.A. Timoshok¹, L.N. Shynkarenko¹,
L.N. Lazarenko¹, N.Y. Spivak¹**

¹ Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, National Academy of Sciences of Ukraine;
154 Acad. Zabolotny St., Kyiv, MSP, D 03680, Ukraine

²National University of Food Technologies; 68 Volodymyrska St, Kyiv, 01033, Ukraine

CHOLESTEROL-LOWERING ACTIVITY OF LACTIC ACID BACTERIA PROBIOTIC STRAINS *IN VIVO*

Cholesterol-lowering activity of probiotic strains of lactic acid bacteria genera Lactobacillus and Bifidobacterium in the in vivo experiments on the model of experimental hypercholesterolemia in mice was studied. It is established that the prophylactic scheme of introduction of probiotic cultures is more effective than therapeutic one for the manifestation of cholesterol activity of probiotic cultures. The most effective were the cultures: L. acidophilus and B. bifidum, as well as the composition B. bifidum + B. longum. Cholesterol-lowering activity of the studied strains and their compositions in this experiment ranged between 40-78%. It is noted that cholesterol activity of other studied strains was not lower, and in some cases, higher than that of most of the drugs currently used in cholesterinosis.

К е у в о р д с: probiotic lactic acid bacteria, cholesterol-lowering activity, cholesterol activity, cholesterol-assimilating strains, cholesterinosis.

In recent years, the number of reports on the ability of lactic acid bacteria to lower serum cholesterol levels is increasing in the scientific literature. The ability of certain strains of normal microflora to assimilate and deconjugate precipitate bile acids as well as to destroy, bind and assimilate cholesterol is the basis of their cholesterol-lowering effect (the ability to reduce cholesterol levels) [5; 4; 7-9]. High cholesterol levels in the serum as a whole and in the low-density lipoprotein is a major risk factor for coronary heart disease and atherosclerosis, and cerebrovascular atherosclerosis, hypertension, cancer of different parts of the digestive tract and some other pathologic conditions [2]. Thus, the purpose of the study was to establish the cholesterol-lowering activity of the previously selected strains of probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* genera in the *in vivo* experiments on the model of experimental hypercholesterolemia in mice.

Materials and Methods. Probiotic strains of genera *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* isolated from associative culture in laboratory studies of fermented biological material: *Bifidobacterium bifidum* VK-1, *Bifidobacterium longum* VK-2, *Lactobacillus acidophilus* IMV B-7279, *Lactobacillus casei* IMV B-7280, *Lactobacillus bulgaricus* IMV B-7281 were used as subjects of the study.

The authors used in the experiments white mice weighing 16-18 and 18-20 g, male mice of the *Balb/c* aged 2.5 months and female mice *Balb/c* aged 3 months. Experimental hypercholesterolemia was simulated in mice by feeding the animals with high-calorie diet (Table 1) for a week. Crystalline cholesterol with chemical purity of > 99% (Sigma, USA) was added to the diet. This model allows raising the serum cholesterol levels in mice by 46.54 ± 2.1% at an average as compared with intact mice.

Two schemes of administration of the probiotic strains – the prophylactic and therapeutic ones

© S.A. Starovoitova, L.P. Babenko, N.A. Timoshok, L.N. Shynkarenko, L.N. Lazarenko, N.Y. Spivak, 2012