

ХЕМІЛЮМІНЕСЦЕНТНИЙ АНАЛІЗ В ПРАКТИЧНІЙ ВЕТЕРИНАРІЇ І БІОТЕХНОЛОГІЇ

(Огляд літератури та результати власних досліджень)

Гордієнко А.Д., д.фарм.н., доцент
Блажівський М.Е.,* д. хім.н., професор
Харківська державна зооветеринарна академія, м. Харків
Національний фармацевтичний університет, м. Харків*

Анотація. В оглядовій статті представлені дані літератури і результати власних досліджень авторів, присвячених науковим основам і практичному використанню хемілюмінесцентного аналізу в ветеринарії і біотехнології.

Ключові слова: хемілюмінесцентний аналіз, вільні радикали, активні форми кисню, аденозинтрифосфат, ветеринарія, біотехнологія.

Актуальність проблеми. Хемілюмінесцентний аналіз (ХЛ аналіз) знаходить усе більше застосування у різноманітних галузях народного господарства та медицини, в тому числі в ветеринарії і біотехнології.

ХЛ аналіз – сукупність методів кількісного (рідше якісного) визначення хімічних елементів і сполук за інтенсивністю хемілюмінесценції або сумою світіння (інтеграл залежності інтенсивності хемілюмінесценції за часом) [1]. Хемілюмінесценція (хімічне світіння) (ХЛ) – надлишкове у порівнянні із тепловим електромагнітне випромінювання оптичного діапазону електронно-збудженою молекулою або іоном під час перебігу хімічної реакції. ХЛ може виникати у будь-якій хімічній реакції, яка має елементарні екзотермічні акти з кількістю виділеної енергії, достатньої для електронного збудження. Світло можуть випромінювати реагуючі частинки, а також проміжні та кінцеві продукти. Реакції ХЛ зазвичай є окисно-відновними реакціями, механізм яких є складний і недостатньо вивчений.

ХЛ найчастіше спостерігається у реакціях вільних радикалів або атомів і пов'язана зазвичай з актами рекомбінації (або диспропорціювання) та приєднання активних частинок до молекул. У рідинно-фазових реакціях ХЛ спостерігається головним чином у реакціях окиснення молекулярним киснем, пероксидом водню та іншими окисниками. Слабка ХЛ реєструється у біологічних системах – рослинах та тканинах органів тварин (самовільна хемілюмінесценція, біохемілюмінесценція), в реакціях окиснення великого кола вуглеводнів, алкохолів, кетонів, кислот, полімерних матеріалів тощо [1, 2].

Будь-який емпірично встановлений вплив того чи іншого реагенту (наприклад, йонів перехідних металів та деяких аніонів, які виступають у ролі каталізаторів, а також органічних сполук – активаторів та інгібіторів хемілюмінесцентних реакцій) на параметри ХЛ, пропорційні швидкості індикаторної реакції та квантовому виходу люмінесценції, може бути основою кількісного методу аналізу на дану речовину, навіть, якщо невідомий механізм виникнення ХЛ [1, 2].

Хімічні активатори та інгібітори хемілюмінесценції. Хімічним активатором ХЛ є речовина, яка сама не каталізує дану хемілюмінесцентну реакцію, але суттєво підвищує її швидкість у присутності певних каталізаторів. Хімічні інгібітори, які пригнічують каталітичну активність, зазвичай зв'язують каталізатор у неактивні комплекси. Інший тип інгібування пов'язаний із обриванням ланцюгів у радикально-ланцюгових каталітичних хемілюмінесцентних реакціях. Інгібіторами радикально-ланцюгових реакцій є феноли, нафтоли, арилами́ни, катехолами́ни, флаваноїди, аскорбінова кислота, деякі алкалоїди, наприклад кофеїн, канабіноїди тощо. Хемілюмінесцентні реакції дозволяють визначати ряд активаторів та інгібіторів, які беруть участь у реакціях, спряжених з хемілюмінесцентними системами [1, 2].

У ХЛ аналізі зазвичай використовуються реакції окиснення хемілюмінесцентних індикаторів, в яких індикаторною речовиною є проміжні сполуки – випромінювачі світіння; окисники – пероксид водню, пероксикислоти, кисень тощо.

Хемілюмінесцентні індикатори (ХЛ індикатори), хромофори – сполуки певної будови, які здатні вступати у хімічні реакції з активними формами кисню (АФК) або органічними вільними радикалами тощо, а відтак утворювати молекули продуктів у збудженому електронному стані, що призводить до виникнення яскравої ХЛ. ХЛ індикатори – під час участі у хемілюмінесцентних

реакціях піддаються незворотному окисненню і не регенеруються [3, 4].

Найпоширенішим представником хемілюмінесцентних індикаторів є *люмінол* – 5-аміно-1,2,3,4-тетрагідро-1,4-фталазиндіон або гідрозид 3-амінофталевої кислоти (H_2L), мол.м. 177,11 г/моль. Під дією окисника (наприклад радикала гідроксилу) відбувається утворення радикала *люмінолу*, який потім вступає у реакцію з супероксиданіонрадикалом кисню $\cdot O_2^-$, утворюючи внутрішній (трансануляний) пероксид (діоксид). Його розкладення призводить до утворення збудженої молекули 3-амінофталату. Перехід цієї молекули у основний стан супроводжується випромінюванням кванту світла. *Люмінол* – хемілюмінесцентний індикатор при кислотно-основному, окисно-відновному (броматометрія тощо) та комплексонометричному титруванні. Застосовують для хемілюмінесцентного визначення мікрокількостей H_2O_2 , АФК (зокрема $\cdot OH$, $\cdot OO\cdot$), $K_3[Fe(CN)_6]$, $S_2O_8^{2-}$, $ClO\cdot$, $KMnO_4$, Cl_2 , Br_2 , гемоглобіну крові (*ГЕМОТЕСТ-М*), $Cu(II)$, $Co(II)$, $Ni(II)$, $Fe(III)$, $Mn(II)$, $Cr(III)$, $Ag(I)$, $Ti(IV)$, $Zr(IV)$, $Ce(IV)$, $V(V)$, $Sb(V)$, платинових металів, а також органічних сполук 8-оксихіноліну, фенілендіамінів, фенолів, катехоламінів, флаваноїдів, аскорбінової кислоти, похідних фосфонової та фосфатної кислот (пестициди, інсектициди, фосфоровмісні бойові хімічні отруйні речовини) з нижньою межею від 0,5 нг до 0,1 мкг до мл кінцевого об'єму.

Другим за значущістю серед хемілюмінесцентних індикаторів є *люцигенін* – динітрат 10,10'-диметил-9,9'-діакридинію (*Lc*), мол. м. 512,51 г/моль. У той час як люмінол випромінює світло в присутності багатьох окисників, світіння люцигеніну виникає лише в присутності гідроген пероксиду і/або $\cdot O_2^-$. У лужному середовищі сильні відновники-нуклеофіли такі як гідразин, диметилгідразин, аскорбінова кислота, цистеїн, *N*-ацетилцистеїн, солі $Fe(II)$, S^{2-} , SO_3^{2-} , SnO_2^{2-} , NH_2OH , $Cr(II)$ тощо викликають яскраву ХЛ в присутності у розчині кисню повітря. За оптимальних умов цей процес є найбільш ефективним серед неферментних хемілюмінесцентних реакцій, відомих у теперішній час [3, 4]. Естери акридинію та недавно запропонований нами новий ХЛ індикатор – 9-ціано-10-метилакридинію нітрат (ЦМА) також вступають у високоефективні реакції з H_2O_2 , даючи акридон [5]. В усіх вказаних реакціях утворюється проміжна сполука одного типу, а саме дуже лабільний заміщений 1,2-діоксетан. Вилученню світла передує узгоджене розщеплення декількох спряжених подвійних зв'язків цього ключового інтермедіату, а відтак відбувається утворення збуджених молекул *N*-метилакридону – емітера ХЛ. У реакціях *люцигеніну* з біологічними відновниками (аскорбінова кислота, глюкоза, фруктоза) та H_2O_2 , а також *люмінолу* з H_2O_2 уведення катіонних поверхнево-активних речовин збільшує інтенсивність ХЛ на порядок [3, 4].

Механізм виникнення ХЛ включає три стадії: 1) атака киснем або H_2O_2 , та утворення гідропероксиду; 2) перетворення у інтермедіат – діоксетан, а також 3) розривання пероксидного зв'язку, що супроводжується випромінюванням світла. На відміну від флуоресцентних методів при проведенні визначення не вимагається додаткового джерела збудження, через що суттєво спрощується постановка експерименту і усувається фонове розсіювання світла. Дозування проб або реагентів може відбуватися дискретно (в аналізаторах дискретних проб) або у неперервному режимі (проточні аналізатори), вимірюється або значення піку світлової інтенсивності, або інтегральна характеристика – сума світіння. Реєстрація параметрів ХЛ може здійснюватися фотоелектрично (на хемілюмінометрі за допомогою фотоелектронного помножувача або кремнієвого фотодіоду із самописцем та електронним інтегратором) та фотографічно (вимірюється лише сума світіння за певний проміжок часу). Перевагами хемілюмінесцентних методів аналізу є висока чутливість, можливість реєстрації інтенсивності світіння у широкому діапазоні значень, що відповідає великому інтервалу концентрації визначуваних речовин (зазвичай декілька порядків). Цей метод аналізу можна здійснювати дуже швидко, оскільки немає необхідності чекати, поки реагуючі речовини досягнуть стану рівноваги [1, 2].

Для проведення ХЛ аналізу вивчаємих зразків нами був сконструйований і виготовлений хемілюмінометр ХЛ-01, оснащений ФЕП-51 з чутливістю $0,43 \cdot 10^7$ (фот)/(4π)/поділлка з термостатуванням і постійним перемішуванням. Прилад прокалібрований в абсолютних одиницях квант/с-4 π згідно з програмами й методиками метрологічної атестації хемілюмінометра, проведеної і затвердженої Національним центром метрології (Харківський НДІ метрології). За допомогою хемілюмінометра можна реєструвати світіння у будь-якому біологічному матеріалі (кров, сироватка, сеча, гомогенати органів і тканин, біологічні рідини) і вивчати процеси вільно-радикального окиснення (ВРО), оцінювати стан прооксидантних і антиоксидантних систем тварин, визначати антиоксидантну активність фармакологічних препаратів, біологічних рідин, харчових добавок, вивчати функціональну активність клітин, виявляти и визначати слідові концентрації різних речовин, проводити контроль мікробіологічної чистоти різних об'єктів.

Хемілюмінесцентний аналіз в ветеринарії. В ветеринарії використовують *хемілюмінесцентний метод діагностики* (ХЛ м.д.) – медико-біологічний метод діагностики різноманітних паталогічних станів та захворювань організму тварин, який базується на результатах

всебічного дослідження процесів регуляції ВРО методом ХЛ біологічного матеріалу. Як і інші відомі фізичні або біологічні методи лабораторної діагностики, які дозволяють визначати концентрацію початкових, проміжних і кінцевих продуктів реакцій окиснення (зміну складу ліпідів крові, дієнових кон'югатів, шифових основ, малонового діальдегіду тощо), ХЛ.м.д. дозволяє вивчати антиоксидантні властивості органів і тканин, активність ферментів, які утилізують перекисні продукти (глутатіонпероксидаза, глутатіонредуктаза) або впливають на вміст АФК (СОД, каталаза, пероксидаза) безпосередньо за параметрами ХЛ біологічних субстратів [6, 7, 8]. Даний метод дозволяє вивчати молекулярні засади метаболічних і фізіологічних процесів, які забезпечують функціональну активність та нормальну життєдіяльність організму; виявляти причини і молекулярні механізми розвитку паталогічних процесів; вивчати стан захисно-приспосувальних реакцій і адаптаційні можливості організму при різноманітних впливах: екологічних, промислово-виробничих, біологічних, медикаментозних тощо. Метод використовується при опрацюванні нових способів діагностики, профілактики і лікування, а також для пошуку БАР, які володіють антиоксидантними властивостями [8, 9, 10, 11, 12].

В поєднанні з традиційними методами діагностики вимірювання ХЛ біологічних субстратів дозволяє отримувати нову надзвичайно цінну інформацію про паталогічні процеси [6, 7, 8]. Перевагами Х.м.д. є можливість прямої реєстрації реакційноздатних нестабільних короткоживучих радикалів з високою чутливістю; техніка реєстрації ХЛ проста і доступна, повністю безпечна для тварин.

В теперішній час накопичилися переконливі дані, що в патогенезі багатьох захворювань сільськогосподарських тварин і птахів приймають участь вільнорадикальні процеси [13, 14, 15, 16, 17]. В зв'язку з цим використання в ветеринарній медичній практиці методів інтегральної оцінки процесів перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ) і антиоксидантного статусу (АОС), заснованих на реєстрації спонтанної або активованої ХЛ тест-об'єкта дозволяють виявити розвиток окиснювального стресу в організмі, обумовленого різними причинами і своєчасно проводити антиоксидантну терапію [18]. За допомогою методу ХЛ вивчений взаємозв'язок інтенсивності процесів ПОЛ у зв'язку з віком і молочною продуктивністю у великої рогатої худоби, вікові закономірності в протіканні вільнорадикальних реакцій ліпідів і стану антиоксидантного захисту у телиць, а також особливості цих процесів у корів при різному фізіологічному стані, що слід враховувати при складанні раціонів годування [13]. Метод ХЛ дозволяє своєчасно виявляти розвиток окиснювального стресу в організмі корів при гострому катаральному ендометриті і коригувати порушення у вільнорадикальному метаболізмі за допомогою системної антиоксидантної терапії [18].

У аналізі клінічних проб за допомогою хемілюмінесцентних методів аналізу визначають не лише активність окремих ферментів, але й концентрацію різних речовин, які беруть участь у ферментних хемілюмінесцентних реакціях. Реакції, які використовують для вивчення АФК, можуть бути модифіковані для визначення активності ферментів АОС організму. При вимірюванні активності відомих ферментів СОД і каталази використовують ксантин-ксантиноксидазну і ацетальдегід-ксантиноксидазну системи, які є генераторами $\cdot\text{OO}\cdot$ і H_2O_2 відповідно. Інтенсивність розкладання цих продуктів реакції в присутності антиоксидантних ферментів вивчають за інтенсивністю ХЛ люмінолової або люцигенинової реакції. Для визначення активності каталази часто застосовують систему люмінол – люцигенін – H_2O_2 [1, 5].

Застосовуючи хемілюмінесцентну систему люмінол – H_2O_2 – пероксидаза (каталізатор) можна здійснювати контроль за перебігом ферментних реакцій за участю оксидаз, в яких утворюється H_2O_2 . На основі цього принципу опрацьовані методики дослідження метаболізму глюкози, холестеролу і фосфоліпідів. Ксантогеназа, β -D-галактоксидаза і глюкозо-6-фосфатдегідрогеназа можуть детектуватися за люміноловою індикаторною реакцією, ХЛ якої пов'язана з утворенням $\cdot\text{OO}\cdot$ і H_2O_2 [1, 5].

Визначення ферменту ліпази ґрунтується на ферментному гідролізі діацетату флуоресцеїну до флуоресцеїну, а відтак впливові на емісію світіння в системі люмінол– H_2O_2 –пероксидаза. Хемілюмінесцентне детектування (за допомогою різних ХЛ індикаторів) компонентів суміші в потоці після їх хроматографічного розділення застосовується для аналізу різноманітних біологічно активних та лікарських речовин. Для післяколонкового детектування у високоефективній рідинній хроматографії найчастіше всього використовують пероксіоксалатні хемілюмінесцентні реакції [5]. ХЛ аналіз використовується також в капілярному електрофорезі, що дозволяє ідентифікувати і кількісно визначати різні компоненти (наприклад, амінокислоти) у складних сумішах. При цьому досягнута висока чутливість ($\cong 10^{-17}$ М) і вибірковість.

Як один з прикладів комерційного використання ХЛ аналізу можна назвати розроблену нами тест-систему на приховану кров „ГЕМОТЕСТ-М” (син. ДЕЛАТЕСТ) – діагностичний засіб

високочутливого та експресного хемілюмінесцентного виявлення залишків крові за гемоглобіном (ГЕМОТЕСТ-М) [5] а також тест „Гемокод”, в основу якого покладена ХЛ фагів. Пробу венозної крові інкубують з харчовими екстрактами, а відтак за інтенсивністю світіння нейрофілів визначають перенесення тих чи інших продуктів. Обидві тест-системи зареєстровані в Україні.

Антиоксидантні властивості БАР можна вивчати на моделі H_2O_2 - ініційованої люмінолзалежної ХЛ сироватки крові інтактних щурів, де в результаті розкладання H_2O_2 вільним Fe^{+2} утворюються вільні радикали (ВР) і АФК [19]. Люмінол активує ХЛ сироватки, взаємодіючи з АФК, які утворюються в результаті ВРО ліпідів сироватки. Досліджувані нами БАР (рослинні поліфенольні антиоксиданти) зв'язують (інактивують) АФК і вільні радикали, які виникають при ВРО ліпідів сироватки і в такий спосіб пригнічують ланцюгові реакції, що проявляється у зниженні спалаху ХЛ сироватки [20,21].

Антиокиснюючу здатність речовин можна вимірювати також за допомогою ХЛ аналізу при застосуванні системи люмінол– H_2O_2 – пероксидаза (або гемоглобін), в якій антиокисники конкурують з люмінолом за участь в реакціях з радикалами кисню, що призводить до зміни параметрів ХЛ в системі. За допомогою ХЛ аналізу можливе визначення ендogenous антиоксидантного рівня біологічних зразків. Промисловість продукує ряд стандартних наборів (зокрема АРАР, АРАР-PLUS) для визначення антирадикальної активності водорозчинних речовин, аскорбінової кислоти, загального АОС системи тощо [5].

Методи ХЛ дозволяють реєструвати АФК. У роботі [22] досліджували склад АФК, які обумовлюють ХЛ в системі люмінол перекис водню у відсутності і після додавання супернатанту мозку щурів. Показано, що в цій системі відбувається продукція переважно супероксидного радикала, синглетного кисню, а також гідроксильного радикала. Параметри ХЛ відбивають потенційну здатність тканини мозку до генерації і перехоплення АФК. Досліджено, що емоційно-больовий стрес викликає зниження генерації АФК за показниками ХЛ в мозку. Застосований метод H_2O_2 -індукованої люмінолзалежної ХЛ дозволяє охарактеризувати потенційну здатність тканини до утворення деяких АФК і разом з іншими методами дослідження ВРО, що передбачають індукцію ВРО *in vitro* (наприклад ТБК-реактивні продукти) оцінити інтенсивність і різноманітність цих процесів.

Модель H_2O_2 -індукованої люмінолзалежної ХЛ можна використовувати при вивченні окиснювального старіння легкоокисних речовин (наприклад ліпідних субстанцій) в лікарських препаратах і у вивченні їх стабільності. Кисень, який утворюється при розкладанні H_2O_2 вступає в реакцію з вільними радикалами органічних молекул, в першу чергу, з ненасиченими жирнокислотними залишками ліпідів з виходом пероксирадикалів RO_2 , в результаті рекомбінації яких висвічуються кванти ХЛ. За кінетичною кривою H_2O_2 -ініційованої ХЛ розчинів, що вивчаються, і суспензій лікарських препаратів оцінюють рівень вільнорадикальних процесів при окиснювальному старінні препаратів. Метод ХЛ є більш високочутливим і швидким в порівнянні, наприклад, з класичним (іодометричним) у визначенні ступеня окиснення легкоокисних лікарських субстанцій. Вказаний метод дозволяє не лише стандартизувати препарати на стабільність відносно їх окиснення, але і підбирати композиції лікарських препаратів з найбільш ефективними антирадикальними інгібіторами, що дозволяють триваліше захищати їх від переокиснення, як одного з основних параметрів якості (стабільності) препарату [23, 24].

Для вимірювання активності інгібіторів ферменту ацетилхолінестерази (АХЕ) застосовують систему люмінол–пероксидаза–(H_2O_2) та проміжну реакцію, в якій холін – продукт первинної реакції холінестеразного гідролізу ацетилхоліну – окиснюється в присутності іншого ферменту холіноксидази до бетаіну з утворенням H_2O_2 . Інтенсивність ХЛ прямо пропорційна активності АХЕ і обернено пропорційна вмісту інгібітора в системі [5].

Для ферментного визначення інгібіторів АХЕ за допомогою ХЛ аналізу нами запропонований оригінальний спосіб, який вдало поєднує високу вибірковість реакції холінестеразного гідролізу субстрату ацетилхоліну з високою чутливістю індикаторної реакції хемілюмінесцентного окиснення люмінолу: активність АХЕ у ферментній реакції оцінюють за залишковою кількістю субстрату, який за допомогою реакції пергідролізу (реакція з надлишком H_2O_2) перетворюють у відповідну надацетатну кислоту, а відтак останню визначають за люміноловою реакцією в присутності H_2O_2 як активатора процесу. Усі реакції відбуваються за оптимальних умов при рН 8,2. Даний метод здійснення ХЛ аналізу дозволяє визначати різноманітні за структурою біологічно активні (інсектициди, пестициди, сильнодіючі та отруйні речовини) та лікарські речовини на нанограмовому (нґ/мл) рівні [5, 25, 26, 27, 28].

Описані прості та експресні методики прямого проточно-інжекційного хемілюмінесцентного визначення пестицидів дихлофосу, монокротофосу, засновані на прямій реакції вказаних пестицидів з люмінолом і пероксидом водню в лужному середовищі, яка підсилює ХЛ [29,30]. Методика успішно

використана для визначення монокротофосу у воді.

Нами розроблені і запропоновані методики, які дозволяють ефективно, експресно та вибірково ідентифікувати за групами та кількісно визначати фосфоровмісні пестициди: ДДВФ, хлорофос, метафос, метилнітрофос (метатіон), трихлорметафос (ТХМ-3), фосфамід (рогор) з люмінолом, а фозалон, карбофос (малатіон), фталофос з люцигенином або нітратом 9-ціано-10-метилакридидіну у пробах води та харчових продуктах (наприклад картопля, морква, буряк, суниця, томати, яблука, груші, виноград, капуста, сливи, фініки, ізюм тощо) хемілюмінесцентним методом [31]. Головною перевагою виконання аналізу методом ХЛ, що вигідно відрізняє його від існуючих газово-хроматографічних, ензимно-кінетичних є можливість здійснення прямого визначення ФОП на рівні допустимих вмістів у пробах води без попередніх операцій концентрування проби (для аналізу зазвичай використовують 0,5 - 1,0 см³ забрудненої ФОП води).

Розроблена і запропонована також методика відбору проб і прямого кількісного визначення пестициду базудину у пробах повітря кінетичним методом ХЛ з використанням люмінолу як індикатора [32]. Визначення ґрунтується на концентруванні базудину із повітря на силікагель з наступною екстракцією препарату хлороформом та ХЛ аналізом з люмінолом фотоелектричним методом. Нижня межа виявлення 0,0025 мкг в 0,5 мл розчину, точність вимірювання ± 20 %, вимірювані концентрації 0,002 – 0,2 мг/м³. Визначенню не заважають в зазначених концентраціях фталофос, фозалон, рогор, дихлофос, гексахлоран, хлорофос, оксиди сульфуру, нітрогену, карбону.

В розроблених методичних рекомендаціях [33] наведені методики відбору проб і кількісного визначення пестициду метатіону у пробах повітря (у вигляді аерозолів) кінетичним методом ХЛ з використанням люмінолу як індикатора без попередньої операції концентрування. Виявлення ґрунтується на концентруванні пари і/або аерозолу метилнітрофосу із атмосферного повітря за допомогою сепаратора сигналізатора АСП (ГО-71) з наступним визначенням препарату фотоелектричним методом ХЛ на рівні допустимих вмістів у пробах повітря робочого простору. Нижня межа виявлення становить 0,0025 мкг або 0,0001 мг/м³ повітря, точність вимірювання ± 20 %, мінімально-вимірювана концентрація 0,0001-0,0002 мг/м³. Визначенню не заважають фталофос, фозалон, фосфамід (рогор), ДДВФ, гексахлоран, хлорофос, оксиди сульфуру, нітрогену, карбону.

Останнім часом увагу широкого круга фахівців привертають різні експрес-методи індикації клітин, у тому числі і мікроорганізмів як у біологічних пробах, об'єктах довкілля, в харчових продуктах і т.д. [34, 35, 36]. У цьому плані інтерес представляє визначення кількості живих клітин біологічним методом за індикацією внутрішньоклітинного вмісту АТФ, метаболіта, присутнього в усіх живих клітинах, вміст якого реально відбиває життєдіяльність клітини. В основі методу лежить взаємодія АТФ, люциферази і люциферину, яка супроводжується виділенням енергії у вигляді випромінювання світла. При цьому час аналізу значно скорочується в порівнянні з рутинними методами, а висока його чутливість порівнюється з полімеразною ланцюговою реакцією. До переваг біологічного методу слід віднести хорошу відтворюваність, можливість обходитися мінімальною кількістю досліджуваного матеріалу і, найголовніше, високу специфічність люциферази до АТФ.

Біохемілюмінесцентну люциферин-люциферазну реакцію використовують не тільки для визначення концентрації АТФ, але й для визначення будь-якого іншого метаболіту і ферменту, які беруть участь в реакціях утворення або розкладання АТФ. Для визначення вмісту АТФ розроблені стандартні набори реагентів – фірми „Sigma” (США), „LKB” (Швеція) та інші, які знайшли широке застосування в медицині, а також синтетично добута серія рекомбінантних світлячків люцифераз, які дозволяють визначати концентрацію нуклеозидтрифосфату в інтервалі концентрацій 0,01 – 10 000 нМ.

Біологічний метод можна використовувати для діагностики маститу у корів, який дозволяє кількісно визначати вміст соматичних клітин (СК) в молоці впродовж декількох хвилин і може бути використаний навіть в польових умовах. Він заснований на виявленні вмісту СК в молоці за концентрацією АТФ в соматичних клітинах. Концентрацію АТФ визначають за допомогою АТФ-реагента, що містить усі необхідні речовини (фермент люциферазу світляків, D-люциферин, сіль магнію і компоненти буферного розчину) для біологічної реакції. При змішенні АТФ-реагента з розчином, в якому знаходиться АТФ, виникає біологічна реакція (світіння) у видимій області. Інтенсивність світіння пропорційна концентрації АТФ в реакційній суміші яку реєструють за допомогою люмінометрів.

Використання ліофільної висушеної високоактивної розчинної рекомбінантної люциферази світляків дозволило оптимізувати біологічний метод визначення СК в молоці за концентрацією АТФ [37]. Запропоновані критерії діагностики маститу за рівнем небактерійного АТФ в молоці. Тривалість аналізу молока складає – 2 хв/зразок [37].

Біолоюмінесцентний метод використовують для визначення кількості живих мікробних клітин у вакцинах бруцельозу [38]. За допомогою методу можна підбирати оптимальні параметри підготовки зразків живих вакцин бруцельозу і проводити контроль на виживання бруцелл в них.

Використання біолоюмінесцентних методів визначення антибіотиків з використанням ефекту інгібування люмінесценції рекомбінантних *E. coli* з вбудованим геном чутливості до тетрацикліну дозволило підвищити чутливість біолоюмінесцентного аналізу з 0,1 мкг/мл до 20 нг тетрацикліну в 1 мл (час виміру 90 хв) в порівнянні з біолоюмінесцентними методами визначення антибіотиків з використанням ефекту інгібування люмінесценції морських бактерій [39].

Показано використання біоіндикації морських бактерій, що світяться, на аналіз БАР [40]. Біолоюмінесценція фотобактерій є інтегральним показником їх метаболізму. Багато фізичних, хімічних і біологічних чинників, що впливають на клітинне дихання, синтез білків, ліпідів, нуклеїнових кислот, стан клітинної мембрани змінюють інтенсивність бактерійного світіння. В результаті дослідження дії великого числа БАР (токсичні речовини, лікарські препарати, фізіологічні середовища) на біолоюмінесценцію бактерій, що світяться, виділено декілька типів реакцій: 1) швидке інгібування біолоюмінесценції ($t < 30$ хв), пов'язане з гострою токсичністю БАР, вираженим антибактеріальним ефектом і тому подібне, 2) інгібуванням росту бактерій, що світяться, пов'язане з проявом хронічної токсичності, 3) активування біолоюмінесценції в результаті взаємодії токсичної речовини з нетоксичною речовиною (фізіологічні середовища, макромолекули, клітини і тому подібне) або власною активуючою дією БАР. Робиться висновок про можливість застосування бактерій, що світяться, для прямого аналізу БАР, що володіють здатністю безпосередньо змінювати характеристики біолоюмінесценції або росту фотобактерій.

Хемілюмінесцентний аналіз в біотехнології. В різних біотехнологічних процесах широко застосовуються клітини мікроорганізмів, водорослей, рослин і тварин, які з успіхом використовуються для отримання органічних кислот, антибіотиків, БАР і т. д. [41, 42, 43, 44, 45].

Найбільш перспективним представляється використання в цих цілях клітин, іммобілізованих різними способами [41]. У більшості випадків необхідною умовою біотехнологічних процесів з використанням іммобілізованих клітин є збереження їх життєздатності. Причому, збереження життєздатності клітин на стадії іммобілізації і підтримка їх життєдіяльності в процесі використання – два самостійні завдання.

Наявні нині способи визначення життєздатності клітин різного походження умовно можна розділити на мікробіологічні і біохімічні. Мікробіологічні методи засновані на визначенні життєздатності клітин за їх можливістю давати потомство, або на фарбуванні клітин вітальними барвниками. Біохімічні методи, як правило, мають на увазі визначення якої-небудь ферментативної активності на цілих клітинах. Мікробіологічні методи припускають висівання клітин і подальше їх вирощування з метою підрахунку утворених колоній. Ці способи надзвичайно трудомісткі, тривалі, вимагають значного числа повторностей і викликають великі труднощі при роботі з анаеробними і спороутворюючими мікроорганізмами. Для роботи з водорослями, клітинами рослин і тварин ці методи взагалі не придатні. Визначення життєздатності клітин за вітальним фарбуванням не завжди коректно, оскільки може дати лише якісну інформацію. Кожен з перерахованих методів дає інформацію про ті або інші функції клітини, проте не може, мабуть, розглядатися як критерій життєздатності клітини в цілому.

Якщо при роботі з вільними клітинами згадані методи незручні, оскільки трудомісткі і не завжди однозначні, то в випадку іммобілізованих клітин вони або зовсім не придатні, або трудоздійснювані, оскільки вимагають відділення клітин від носія. Для агарового, каррагінанового і альгінатного гелів розроблені методи руйнування, що дозволяють вивільнити клітини з матриці гелю з метою подальшого висіву і підрахунку колоній, що утворилися. Проте умови, необхідні для руйнування структури цих гелів, можуть впливати на життєздатність клітин і викривляти реальну картину. У випадках іммобілізації шляхом адсорбції, хімічного з'єднання з носієм або включення в синтетичні полімери, вивільнення клітин взагалі неможливе або вимагає дій, летальних для клітин (нагрівання, обробка кислотами, органічними розчинниками).

Таким чином, для визначення життєздатності іммобілізованих клітин потрібний метод, який може бути застосований до будь-яких клітин, іммобілізованих різними способами (включення в матрицю гелів або синтетичних полімерів, адсорбція, хімічне пришиття до носія), і не вимагає попереднього відділення клітин від носія. Найбільш перспективне використання в цих цілях біолоюмінесцентного методу визначення внутрішньоклітинного вмісту АТФ, який відтворює життєздатність клітин.

Нині біолоюмінесцентний метод визначення АТФ широко використовують при роботі з різними мікроорганізмами, клітинами тваринного і рослинного походження. За допомогою цього методу стежать за ростом культур, мікроорганізмів, досліджують енергетику вищих рослин, успішно

використовують для вивчення токсичної дії ряду сполук на ріст мікроорганізмів, використовують як критерій росту клітин на нерозчинному субстраті, визначають мікробне зараження в технологічних рідинах і т. д. [42].

Принципово новим напрямом у біолюмінесцентному аналізі стало використання іммобілізованих люцифераз. Отримані високоактивні біолюмінесцентні реагенти за допомогою іммобілізації люцифераз мають переваги використання в аналітичних цілях: вища стабільність при зберіганні і в роботі, можливість багаторазового використання, менша чутливість до інгібіторів, присутніх в зразку, який піддається аналізу (плазмі, сироватці і т. д.), менша вартість і економніша витрата ферменту, що знижує вартість одиничного аналізу.

У роботі [46] для визначення АТФ у вільних і іммобілізованих мікроорганізмах використовували реагент на основі іммобілізованої люциферази світляків. Реагент вміщує іммобілізовану на BvCN-сефарозі люциферазу, люциферин, солі магнію, компоненти буферної суміші і стабілізуючі добавки. Для екстракції АТФ з клітин використовували 90% -й диметилсульфоксид. Пропонований спосіб визначення життєздатності клітин в іммобілізованому стані за концентрацією АТФ біолюмінесцентним методом може з успіхом використовуватися для оцінки різних біокаталізаторів на основі цілих клітин, особливо ефективно в тих випадках, коли традиційні методи контролю неприйнятні [46].

Метод біолюмінесцентної АТФ-метрії дозволяє здійснювати контроль метаболічного стану живих клітин в процесі ферментації на різних стадіях росту біомаси в культурі [47, 48].

Таким чином завдяки експресності, чутливості, можливості автоматизації вимірювання і комп'ютерної обробки одержаних результатів ХЛ аналіз знаходить все більш широке застосування для вирішення практичних завдань у аналітичній хімії, фармацевтичному аналізі, біології, медицині, сільському господарстві, а також ветеринарії і біотехнології.

Висновки

1. Аналіз даних літератури свідчить про широке використання хемілюмінесцентного аналізу в опрацюванні нових способів діагностики, профілактики і лікування тварин, а також для пошуку БАР, які володіють антиоксидантними властивостями.

2. Запропонований оригінальний спосіб ферментного визначення інгібіторів АХЕ за допомогою хемілюмінесцентного аналізу, який дозволяє визначати різноманітні за структурою біологічно активні (інсектициди, пестициди, сильнотоксичні та отруйні речовини) та лікарські речовини на нанограмовому (*нг/мл*) рівні.

3. Розроблені і запропоновані методики, які дозволяють ефективно, експресно та вибірково ідентифікувати за групами та кількісно визначати фосфоровмісні пестициди: ДДВФ, хлорофос, метафос, метилнітрофос (метатіон), трихлорметафос (ТХМ-3), фосфамід (рогор) з люмінолом, а фозалон, карбофос (малатіон), фталофос з люцигенином або нітратом 9-ціано-10-метилакридинію у пробах води та харчових продуктах хемілюмінесцентним методом. Головною перевагою виконання аналізу методом ХЛ, що вигідно відрізняє його від існуючих газово-хроматографічних, ензимно-кінетичних є можливість здійснення прямого визначення ФОП на рівні допустимих вмістів у пробах води без попередніх операцій концентрування проби.

4. Біолюмінесцентний метод індикації внутрішньоклітинного вмісту АТФ є перспективним в діагностиці захворювань, підборі оптимальних параметрів підготовки зразків живих вакцин, визначення антибіотиків в нг кількості, токсичності БАР, а також в здійсненні контролю метаболічного стану живих клітин в процесі ферментації на різних стадіях росту біомаси в культурі.

Література

1. Бабко А.К., Дубовенко Л.І., Луковская Н.М. Хемілюмінесцентный анализ. – К.: 1966. – С.145.
2. Владимиров Ю.А. Активированная хемілюмінесценция и биохемілюмінесценция как инструмент в медико-биологических исследованиях / Ю.А. Владимиров // Соросовский образовательный журнал. – 2001. – Т.7. – №1. – С.14–20.
3. Индикаторы / Под ред. Э. Бишона. – М.: 1976. – Т.2. – С. 165.
4. Chemiluminescence in analytical chemistry / Ed. By Ana M. Garcia-Campana. – New York; Basel. – 2001. – P.146.
5. Блажеєвський М.Є. Хемілюмінесцентний аналіз / М.Є.Блажеєвський // Фармацевтична енциклопедія. – 2-ге вид. – К.: Моріон, 2010. – С.1527–1528.
6. Рыжикова М.А. Хемілюмінесцентные методы исследования в лабораторной диагностике / М.А. Рыжикова, Д.М. Габитова, С.В. Сибиряк // Клиническая лабораторная диагностика. – 2001. – № 11. – С. 36–42
7. Дружина Н.А. Хемілюмінесцентные методы в биохимических исследованиях / Н.А.Дружина, А.Ю. Моисеев // Укр. біохім. журн. – 2005. – № 2. – С.18–26.

8. Блажеєвський М.Є. Хемілюмінісцентний метод діагностики / М.Є. Блажеєвський, А.Д. Гордієнко // Фармацевтична енциклопедія. – 2-ге вид. – К.: Моріон, 2010. – С.1528.
9. Study on the inhibitory effect of tannins and flavonoids against the 1,1 – diphenyl-2 picrylhydrazyl radical / T. Yokozawa, C.P. Chen, E. Dong et al. // Biochem. Pharmacol. – 1998. – Vol.56, № 2. – P.213–222.
10. Антиоксидантні властивості екстракту листяв аронії (ARONIA MELANOCARPA) / О.М. Іпатова, Н.Н. Прозоровська, І.Ф. Русина і др. // Біомедицинська хімія. – 2003. – №2. – С.165–176.
11. Косолапов В.А. Изучение антирадикальной активности новых соединений методами хемилюминисценции / В.А. Косолапов, А.А. Спасов, В.А. Анисимова // Биомедицинская химия. – 2005. –Т.51. – Вып.3. – С.287–294.
12. Влияние антиоксидантного препарата на основе биофлавоноидов и витамина С на антиоксидантную активность плазмы крови / И.В.Бабенкова, Ю.О. Теселкин, А.В.Асейчев, Б.Х. Ягмуров // Вопросы питания. – 1999. – №3. – С.9–11.
13. Копылов С.Н. Перекисное окисление липидов у коров / С.Н. Копылов, Е.В. Пименов // Ветеринарная медицина. – 2012. – №1. – С.45 – 47.
14. Багаутдинов А.М. Перспективы изучения свободнорадикального окисления и применение хемилюминесцентных методов исследования в биологии и медицине, сельском хозяйстве и ветеринарии / А.М.Багаутдинов, В.Н.Байматов, Р.Р.Фархутдинов // Актуальные вопросы биологии и медицины: Сб. науч. тр. – М., 2006. – С. 15–19.
15. Бузлама В.С. Активные формы кислорода, антиоксиданты, адаптогены / В.С. Бузлама // Свободные радикалы, антиоксиданты и здоровье животных: Мат. между. науч.-практ. конф., г. Воронеж, 21–23 сент. 2004 г. – Воронеж, 2004. – С. 183–186.
16. Кармолиев Р.Х. Свободнорадикальная патология в этиопатогенезе болезней животных / Р.Х. Кармолиев // Ветеринария. – 2005. – № 4. – С. 42–47.
17. Рецкий М.И. Перекисное окисление липидов и система антиоксидантной защиты у телят при бронхопневмонии / М.И. Рецкий // Итоги и перспективы научных исследований по проблемам патологии животных и разработке средств и методов терапии и профилактики. – Воронеж. – 2002. – С. 33–36.
18. Степанова И.П. Метод для выявления окислительного стресса у крупного рогатого скота / И.П. Степанова // Ветеринария. –2005. –№8. – С.47–49.
19. Кузьменко А.И. Характеристика H₂O₂-инициированного окисления липидов сыворотки крови по кинетическим параметрам хемилюминесценции / А.И. Кузьменко // Укр. биохим. журнал. – 1999. – Т.71, №4. – С.63–66.
20. Гордієнко А.Д. Використання перекисіндукованої люмінолзалежної хемілюмінісценції в визначенні антиоксидантної активності лікарських препаратів / А.Д. Гордієнко, С.А. Гращенкова, П.А. Гордієнко // 3 Міжнародна науково-практична конференція "Наука і соціальні проблеми суспільства: Медицина, фармація, біотехнологія" Тези доповідей ч.1 21-23 травня 2003 р. м.Харків. –2003р. – С.83.
21. Гордієнко А.Д. Інгібування H₂O₂-індукованої люмінолзалежної хемілюмінісценції сироватки крові щурів новими рослинними поліфенолами / А.Д. Гордієнко, Л.В. Яковлева // Медична хімія. – 2008. – Т.10. – № 1. – С. 80–83.
22. Применение перекисиндуцированной люминолзависимой хемилюминисценции для исследования свободнорадикальных процессов в мозге / Ю.В. Моисеева, М.В.Онуфриев, Н.А.Лазарева, Н.В. Гуляева // Нейрохимия. – 1995. – Т.12. – Вып.3. – С.65–69.
23. Тихонов А.И., Ярных Т.Г. Технология лекарств. Учебник для студентов высших учебных заведений. Под редакцией академика Тихонова А.И. – Харьков: Оригинал, 2006. –703 с.
24. Фармацевтичні та медико-біологічні аспекти ліків. За редакцією професора І.М. Перцева. Навчальний посібник. – Вінниця: Нова книга, 2007. – 725 с.
25. Бойові токсичні речовини / В.А.Дядченко, М.Є. Блажеєвський, Н.М. Новіков та ін. // Навчальний посібник. Вид. 2-е, доп. та перероб. – Харків: ФВП «НТУ ХПІ», 2007. – 512 с.
26. Блажеєвський М.Є. Хемілюмінісцентне визначення деяких фосфоромісних пестицидів за реакцією SCHONEMANN / М.Є. Блажеєвський // Вопр. хімії і хім. технолог. – 2004. – № 1. – С. 12–16.
27. Хемілюмінісцентне визначення фозалону та фталофосу за допомогою нітрату 9-ціано-10-етилакридинію / М. Блажеєвський, О. Гута, С. Мідяний, І. Пацай // Вісник Львів, ун-ту. Серія хім. – 2005. –Вип. 46. – С 135–139.
28. Технічні засоби індикації отруйних речовин / М.Є. Блажеєвський, Г.В. Сахаров, С.І. Петров, А.І. Баталов та ін. // Навч. посібник. Вид. 2-е. – Харків: ХІТБ, 2006. – 280 с.

29. Wang Haixia. Development of a luminal-based chemiluminescence flow-injection method for the determination of dichlorvos pesticide / Wang Haixia, Yang Fengzhen, Zhang Xinrong // *Talanta*. – 2001. – V. 54, № 6. – P. 165–1193.
30. Du Jianxiu. Determination of monocrotophos pesticide by flow-injection chemiluminescence method using luminol-hydrogen peroxide system / Du Jianxiu, Liu Xiaoyu, Lu Jiuru // *Anal.Lett.* – 2003. – V. 36, № 5. – P. 1029–1038.
31. Гордієнко А.Д. Санітарно-гігієнічне дослідження води і харчових продуктів на вміст фосфорорганічних пестицидів із застосуванням методу хемілюмінесценції: методичні рекомендації // А.Д.Гордієнко, М.Є. Блажеєвський. – Харків: РВВ ХДЗВА. – 2013. – 18 с.
32. Гордієнко А.Д. Виявлення метатіону в атмосферному повітрі методом хемілюмінесценції: методичні рекомендації // А.Д.Гордієнко, М.Є. Блажеєвський. – Харків: РВВ ХДЗВА. – 2013. – 10 с.
33. Гордієнко А.Д. Кількісне визначення базудину у повітрі методом хемілюмінесценції: методичні рекомендації // А.Д.Гордієнко, М.Є. Блажеєвський. – Харків: РВВ ХДЗВА. – 2013. – 10 с.
34. Кузиков А.Н. Применение биoluminesцентного метода определения бактериального аденозинтрифосфата (АТФ метрии) в микробиологии / А.Н. Кузиков, В.М.Бондаренко, А.Т. Латкин // *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. – 2003. – №1. – С.80–89.
35. Угарова Н.Н. Биоаналитические применения люциферазы светляков (Обзор) / Н.Н.Угарова // *Прикладная биохимия и микробиология*. – 1993. –Т. 29, Вып. 2. – С.180–192.
36. Бровко Л.Ю. Оптимизация биoluminesцентного метода определения микробной биомассы / Л.Ю. Бровко, И.Ю.Трдатын, Н.Н.Угарова // *Прикладная биохимия и микробиология*. – 1991. –Т. 27, Вып.1. – С.134–141.
37. Биoluminesцентный метод диагностики мастита у коров / Фрунджян В.Г., Дорошина О.С., Лебедева О.В. и др. // *Ветеринария*. – 2005. –№ 6. – С. 40–44.
38. Зверев Д.С. Оптимизация биoluminesцентного метода для определения количества живых микробных клеток в бруцеллезных вакцинах / Д.С. Зверев, О.Д. Спяров // *Ветеринарная медицина*. – 2009. –№ 1–2. – С. 49–50.
39. Влияние антибиотиков на люминисценцию рекомбинантных клеток *Escherichia coli*, активированных сывороткой / Т.В. Асризли, И.И. Власова, Е.М. Гаврилова, В.С. Данилов // *Биотехнология*. – 2002. – № 2. – С. 85–93.
40. Кацев А.М. Анализ биологически активных веществ с использованием морских светящихся бактерий / А.М. Кацев // *Новые технологии получения и применения биологически активных веществ. Международная научно-практическая конференция. Тезисы докладов. 20–25 мая 2002. Алушта. Крым*. – С.112–113.
41. Елинов Н.П. Основы биотехнологии. – М.: Наука, 1995. – 583 с.
42. Бейли Дж., Омис Д. Основы биохимической инженерии / Пер. с англ. В 2-х частях. – М.: Мир, 1989. – 1282 с.
43. Биотехнология клеток животных / Пер. с англ. под ред. Р.Е. Спирер, Дж.Б. Гриффитс. – М.: Агропромиздат, 1989. – 365 с.
44. Сергеев В.А., Собко Ю.А. Культуры клеток в ветеринарии и биотехнологии. – К.: Урожай, 1990. – 152 с.
45. Рудишин С.Д. Основы біотехнології рослин: Навч. посібник. – Вінниця, 1988. – 223 с.
46. Угарова Н.Н. Имобилизованные биoluminesцентные системы в аналитической биохимии и биотехнологии / Н.Н. Угарова, Л.Ю. Бровко, О.В. Лебедева // *Итоги науки и техники. Биотехнология*. Москва, 1986. – Том. 6. – С. 88–163.
47. Гордієнко А.Д. Біолюмінесцентний контроль ферментаційних процесів в біореакторі / А.Д.Гордієнко, В.І.Чуешов, П.А. Гордієнко // 3 Міжнародна науково-практична конференція "Наука і соціальні проблеми суспільства: Медицина, фармація, біотехнологія" Тези доповідей ч.2. 21-23 травня 2003 р. – Харків. – 2003. – С. 255.
48. Биoluminesцентная АТФ-метрия в биотехнологии и фармации / А.Д. Гордиенко, Д.И. Дмитриевский, В.И. Чуешов, П.А. Гордиенко // *Тез. V1 Нац. з'їзду фармацевтів України*. – Харків. – 2005. – С. 154–155.

ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНТНИЙ АНАЛІЗ В ПРАКТИЧЕСЬКІЙ ВЕТЕРИНАРІЇ І БІОТЕХНОЛОГІЇ
(Обзор литературы и результаты собственных исследований)

Гордиенко А.Д., д. фарм.н., доцент, Блажиевский Н.Е., *д. хим.н., профессор
Харьковская государственная зооветеринарная академия, г.Харьков
Национальный фармацевтический университет, г.Харьков*

Аннотація. В обзорній статті представлені дані літератури і результати власних досліджень авторів, присвячених науковим основам і практичному використанню хемілюмінесцентного аналізу в ветеринарії і біотехнології.

Ключові слова: хемілюмінесцентний аналіз, вільні радикали, активні форми кисню, аденозинтрифосфат, ветеринарія, біотехнологія.

CHEMILUMINESCENT ANALYSIS IN PRACTICAL VETERINARY MEDICINE AND BIOTECHNOLOGY
(Literature review and results of our own experiments)

Gordiyenko A.D., doctor of pharmacological science, reader, Blazhievsky M.E.,* doctor of chemical science, professor

Kharkiv State Zooveterinary Academy, Kharkiv
National Pharmaceutical University, Kharkiv*

Summary. The data published and the results of our own investigations devoted to the scientific principles and practical use of the chemiluminescent analysis in veterinary medicine and biotechnology have been presented in the review article.

Key words: chemiluminescent analysis, free radicals, active forms of oxygen, adenosinotriphosphate, veterinary medicine, biotechnology.

УДК 54.02:661.122:579.873.13

ФАРМАКОЛОГІЧНА АКТИВНІСТЬ ТАБЛЕТОВАНОГО ПРОБІОТИКА З КИШКОВОРІЗЧИННИМ ПОКРИТТЯМ ПРИ ЛІКУВАННІ ДИСБІОЗУ

Гордієнко П.А., ст.лаб.

Чуєшов В.І., д. фарм.н., професор

Гордієнко А.Д.,* д. фарм.н., доцент

Кудокоцева О.В.,**к.біол.н., с.н.с.

Національний фармацевтичний університет, м.Харків

Харківська державна зооветеринарна академія, м.Харків*

Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, м. Харків**

Анотація. Показано, що використання експериментального зразку нового бактерійного препарату – таблеток "Біфілак" з кишковорозчинним покриттям нормалізує рівень біфідобактерій і лактобактерій, та пригнічує ріст умовно-патогенної мікрофлори у кишечнику на моделі експериментального дисбіозу у кролів, викликаного антибіотиком ампіоксом.

Ключові слова: дисбіоз, ліофілізований біфідумбактерин і лактобактерин, таблетки з кишковорозчинним покриттям, антибіотик ампіокс.

Актуальність проблеми. Основними засобами профілактики та лікування дисбіозу є препарати пробіотики [1,2]. Пробиотики являють собою моно- або складні культури живої або інактивованої біомаси фізіологічної мікрофлори кишечника, дія якої направлена на відновлення або формування природних біотопів мікроорганізму.

Зареєстровані на ринку України фармакопейні пробіотичні препарати, збагачені пробіотичними культурами, за винятком капсул Біфіформ (Fergosan, Данія) з кишковорозчинним покриттям, є не стійкими в кислому середовищі [3]. Внаслідок дії кислого середовища шлунку велика кількість живих мікробних культур, що містяться у препаратах, інактивується, не досягнувши кишечника, де вони, в основному, і надають терапевтичну дію [3, 4].

Труднощі отримання лікарських форм з пробіотиками й їх зберігання, пов'язані з їх високою гігроскопічністю, що є однією з перешкод створення стабільних препаратів [5]. Одним із способів підвищення стабільності є нанесення на поверхню лікарських форм покриттів, зокрема кишковорозчинних, що забезпечують захист від дії вологи, з можливістю їх тривалого зберігання, захисту від дії кислого середовища шлунку та здатністю розчинятися у кишечнику [6]. Останнім часом актуальним є нанесення кишковорозчинних покриттів з водних дисперсій полімерів [6]. Одним з таких продуктів для отримання плівкового кишковорозчинного покриття є готова композиція SeleCoat™, плівкоутворювачем у складі якої є сополімер метакрилової кислоти тип с-Kollocoat® MAE 100P [6].