

**НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ**  
**Інститут проблем кріобіології і кріомедицини**

**БАБІНЕЦЬ ОЛЬГА МИХАЙЛІВНА**

УДК 615.832.9:61.084:579.61:616.34

**БІОЛОГІЧНІ ВЛАСТИВОСТІ ІММОБІЛІЗОВАНИХ НА  
ЕНТЕРОСОРБЕНТАХ ПРОБІОТИКІВ ПІСЛЯ НИЗЬКОТЕМПЕРАТУРНОГО  
ЗБЕРІГАННЯ**

14.01-35 – кріомедицина

**Автореферат**

дисертації на здобуття наукового ступеня

кандидата медичних наук

Харків–2016

Дисертацією є рукопис

Робота виконана в Інституті проблем кріобіології і кріомедицини НАН України

**Науковий керівник:**

Кандидат медичних наук, старший науковий співробітник

**Висеканцев Ігор Павлович**

Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, завідувач відділу кріомікробіології

**Офіційні опоненти:**

Доктор медичних наук, професор **Бірюкова Світлана Василівна**, Харківська медична академія післядипломної освіти МОЗ України, професор кафедри клінічної імунології та мікробіології

Доктор медичних наук, професор **Шепітько Володимир Іванович**, ВДНЗУ МОЗ України «Українська медична стоматологічна академія», завідувач кафедри гістології, цитології та ембріології

Захист відбудеться «27» вересня 2016 року о 13-30 годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 64.242.01. при Інституті проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, 61016, м. Харків, вул. Переяславська, 23

З дисертацією можна ознайомитися у бібліотеці ІПКіК НАН України за адресою: 61016, м. Харків, вул. Переяславська, 23

Автореферат розіслано «26» вересня 2016 р.

Вчений секретар  
спеціалізованої вченої ради  
доктор біологічних наук, професор

Розанов Л. Ф.

## ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

**Актуальність теми.** За даними Центру медичної статистики МОЗ України на 100 тисяч населення країни нараховується біля 18 тисяч хворих, які мають гастроентерологічну патологію. У значній кількості з них діагностують дисбіоз кишечника – клініко-лабораторний синдром, який характеризується змінами якісного і кількісного складу нормальної пристінкової мікрофлори кишечника, метаболічними та імунними порушеннями (Шендеров Б. А., 1998; Харченко Н. В., 2006; Magalhaes J. G., 2007). В останні десятиліття дисбіоз кишечника став дуже поширеним явищем (Шендеров Б. А. 2001; Lebenthal E., 2003; Conway S., 2005; Дранник Г. Н., 2009).

Для корекції мікробіоценозу кишечника при дисбіотичних станах використовують пробіотики, пребіотики, синбіотики, метабіотики, пробіотичні біологічно активні домішки (Drago L., 2010; Hardy H., 2013; Бондаренко А. В., 2014). Найбільш часто застосовують пробіотики і синбіотики – препарати, які містять живі клітини пробіотичних штамів мікроорганізмів. Ефективність застосування таких фармакологічних засобів доведена результатами рандомізованих контрольованих досліджень та підсумкована метааналізами експертів Кокранівського співробітництва (Cimperman L., 2011; Zheng Y. J., 2012; Videlock E. J., 2012; Shan L. S., 2013; Незгода І. І., 2013; Wong S., 2014). Вимоги до пробіотичних препаратів викладено в практичних рекомендаціях і рапортах Food and Agriculture Organization, World Health Organization, World Gastroenterology Organisation (2002, 2008, 2011, 2012, 2014 pp.).

В деяких випадках ефективність пробіотикотерапії низька або зовсім відсутня (Daneman N., 2013; Johnson D. A., 2014; Rodriguez S., 2014). Причинами цього можуть бути загибель частини клітин при проходженні через природні захисні бар'єри шлунково-кишкового тракту (ШКТ) або неможливість інтеграції пробіотика в біоплівку кишечника (Дармов І. В., 2011; Чичерин І. Ю., 2012). У зв'язку з цим набуло актуальності створення нових полівалентних або комбінованих препаратів із іммобілізованими пробіотиками (Ушакова Н. А., 2012; Бондаренко А. В., 2014). Більшість досліджень у цьому напрямку присвячено вивченню іммобілізації пробіотиків у гелевих носіях. Розробку препаратів пробіотиків, іммобілізованих на твердих носіях, розпочато в останній період. Переважну кількість комерційних пробіотичних препаратів зберігають за допомогою ліофілізації. Такими лікарськими формами є капсули, порошки, таблетки, свічки. Ліофілізовані форми пробіотичних препаратів мають наступні недоліки: тривалий час, необхідний для відновлення клітин після ангідробіозу і переходу в активний фізіологічний стан, пошкодження під час ліофілізації рецепторів адгезії, селективна дія ліофілізації, безпосередня загибель мікробних клітин, обмежені терміни зберігання (Zarate G., 2006; Strasser S., 2009; Jalali M., 2012). Уникнути вищезазначених недоліків дозволяє низькотемпературне зберігання, про що свідчать численні публікації (Moayednia N., 2009; Kang M.-S., 2012; Daneshi M., 2013; Ferdousi R., 2013). Дослідження ефективності низькотемпературного зберігання іммобілізованих на сорбентах пробіотиків до цього часу не проводили.

У зв'язку з вище викладеним вивчення збереженості життєздатності, біологічних властивостей, терапевтичної ефективності пробіотиків після іммобілізації на сорбентах та наступного зберігання при низьких температурах дозволить розробити технології виробництва пробіотичних препаратів IV покоління та дійових методів їх довгострокового зберігання.

**Зв'язок з науковими програмами, планами, темами.** Робота виконана в рамках основного напрямку наукової діяльності Інституту проблем кріобіології і кріомедицини Національної академії наук України «Дослідження механізмів кріоушкоджень, кріозахисту, природної стійкості біологічних об'єктів до холоду», науково-дослідної роботи «Дослідження механізмів кріоушкоджень і кріозахисту іммобілізованих клітин з метою підвищення їх збереженості при кріоконсервуванні та ліофілізації (шифр теми 2.2.6.54, № держреєстрації 0110U000404).

**Мета і задачі дослідження.**

Метою роботи є обґрунтування умов довгострокового зберігання іммобілізованих на ентеросорбентах пробіотиків.

Для досягнення поставленої мети було необхідно вирішити наступні задачі.

1. Дослідити адсорбційну здатність ентеросорбентів різної природи по відношенню до мікроорганізмів і експериментально визначити умови іммобілізації пробіотиків на ентеросорбентах.

2. Розробити метод оцінки збереженості комплексів «носій (ентеросорбент)-клітини».

3. Дослідити вплив умов кріоконсервування (швидкість охолодження, склад середовища консервування) на збереженість комплексів «носій-клітини».

4. Визначити збереженість пробіотиками резистентності до шлункового соку, жовчі, антибіотиків, спектрів цукролітичної активності, спектрів антагоністичної активності по відношенню до патогенних та умовно-патогенних мікроорганізмів після іммобілізації на ентеросорбентах і кріоконсервування.

5. Провести дослідження впливу температурних режимів і термінів зберігання на збереженість іммобілізованих на ентеросорбентах пробіотиків.

6. Вивчити терапевтичну дію іммобілізованих на ентеросорбентах пробіотиків, які зберігали при низьких температурах, під час корекції експериментального дисбіоза у лабораторних тварин.

**Об'єкт дослідження.** - Вплив низькотемпературного зберігання на біологічні властивості пробіотиків, іммобілізованих на ентеросорбентах.

**Предмет дослідження.** - Біологічні властивості пробіотиків, які забезпечують корекцію мікробіоценозу кишечника при дисбіозі, після іммобілізації на ентеросорбентах і наступного низькотемпературного зберігання.

**Методи дослідження.** Спектрофотометрія, колориметрія – для визначення адсорбційної здатності сорбентів, світлова мікроскопія – для вивчення зразків мікроорганізмів та гістологічних препаратів, растрова електронна мікроскопія (РЕМ), люмінесцентна мікроскопія (ЛМ) – вивчення комплексів «носій-клітини», моделювання хіміотерапевтичного дисбіозу кишечника – для оцінки терапевтичної дії іммобілізованих пробіотиків, мікробіологічні методи оцінки життєздатності й біологічних властивостей та ідентифікації мікроорганізмів, програмне охолодження

зразків, іммобілізація мікробних клітин на ентеросорбентах, визначення збереженості комплексів «носій-клітини», статистичний аналіз.

**Наукова новизна одержаних результатів.** Вперше розроблено спосіб визначення збереженості ізолюваних комплексів «носій (сорбент)-клітини». У роботі набуло подальшого розвитку вивчення умов сорбції на іммобілізацію мікробних клітин на сорбентах. Показано, що ефективність іммобілізації залежить від хімічного складу сорбентів, температури і тривалості сорбції. Визначено умови іммобілізації пробіотиків *S. boulardii*, *B. bifidum*, *L. bulgaricus* на ентеросорбентах на основі активованого вугілля («Сорбекс», «СУМС-1»). Встановлено, що під час низькотемпературного консервування на збереженість комплексів «носій-клітини», як і на життєздатність вільних клітин у суспензіях, впливають видова кріорезистентність мікроорганізмів, швидкість охолодження, склад середовищ консервування та будова носія. Визначено ефективні умови охолодження та температурні режими подальшого зберігання пробіотиків *S. boulardii*, *B. bifidum*, *L. bulgaricus*, іммобілізованих на ентеросорбентах «Сорбекс», «СУМС-1». Показано, що процес іммобілізації пробіотиків на ентеросорбентах і наступне кріоконсервування не впливають на спектри цукролітичної і антагоністичної активності, спектри антибіотикорезистентності, на чутливість до розчинів соляної кислоти, які формують шлунковий сік. Резистентність до солей жовчі підвищується. Встановлено, що іммобілізовані на ентеросорбентах пробіотики до та після низькотемпературного зберігання виявляють виражену терапевтичну дію під час корекції експериментального хіміотерапевтичного дисбіоза у лабораторних тварин. Вперше показано, що відновлення пристінкової мікрофлори товстої кишки та ерадикація транслокованої кишкової мікрофлори із внутрішніх органів після введення іммобілізованих пробіотиків відбуваються значно раніше, ніж у разі терапії вільними клітинами пробіотиків та препаратами ентеросорбентів. Низькотемпературне консервування забезпечує збереженість на носіях репродуктивних доз клітин пробіотиків, достатніх для корекції дисбіозу.

**Практичне значення одержаних результатів.** Розроблений спосіб корекції дисбіозу кишечника, який полягає в використанні пробіотичного препарату клітин *S. boulardii*, іммобілізованих на ентеросорбенті, дозволяє створити комерційні препарати пробіотиків IV покоління для подолання колонізаційної резистентності і створення умов відновлення популяції ценобіонтів хазяїна (Патент України №76142). Розроблений спосіб визначення життєздатності мікробних клітин, іммобілізованих на носіях, дозволяє оцінювати збереженість комплексів «носій-клітини» на всіх етапах низькотемпературного консервування (Патент України №72110). Цей спосіб використовують при виконанні науково-дослідних робіт в ІПКіК НАН України при розробці технологій низькотемпературного зберігання іммобілізованих на носіях пробіотиків. Результати роботи дозволять розширити можливості для конструювання систем доставки ліків спрямованої дії. Отримані результати були використані в циклі лекцій і семінарів для лікарів КЗОЗ «ХГМБ №18».

**Особистий внесок здобувача.** Дисертація є самостійним науковим дослідженням. Основні результати роботи одержані здобувачем особисто. Автор дисертаційної роботи разом із науковим керівником провела патентно-інформаційне

дослідження наукової проблеми, визначила тему, мету та задачі роботи, а також методи досліджень. Здобувач брала безпосередню участь у проведенні експериментів, результати яких представлено в роботі. Статистична обробка, аналіз, інтерпретація та узагальнення одержаних результатів, формулювання основних положень і висновків проведено автором самостійно. В опублікованих разом зі співавторами роботах особистий внесок здобувача полягає в наступному:

- у проведенні експериментів із обґрунтування параметрів іммобілізації мікробних клітин на ентеросорбентах [2, 10, 14, 25, 27];
- в оцінці життєздатності вільних та збереженості іммобілізованих клітин мікроорганізмів-пробіотиків [1, 3–11, 13, 15–17, 20, 22, 23, 25, 27, 30, 33, 35, 37–39];
- у спектрофотометричному дослідженні адсорбційної здатності сорбентів [2, 14, 25, 31];
- у вивченні біологічних властивостей іммобілізованих клітин мікроорганізмів-пробіотиків [1, 3, 5, 8, 9, 11, 12, 15, 18, 20–24, 26, 28–30, 32, 33–35, 37, 39];
- у моделюванні хіміотерапевтичного дисбіозу кишечника та імуносупресії у тварин [4, 8, 9, 15, 19, 21–24, 32, 33, 36, 37, 39];
- у вивченні видового і кількісного складу мікробіоценозу кишечника [4, 8, 11, 15, 19, 21–24, 32, 33, 37–39];
- у підготовці зразків для РЕМ та ЛМ [8, 38];
- у мікробіологічному дослідженні внутрішніх органів тварин після транслокації в них кишкової мікрофлори [4, 21–24, 32, 33, 38];
- у підготовці зразків мікроорганізмів до низькотемпературного консервування та оцінці їх збереженості [1, 3–13, 16–18, 20, 23, 24, 27, 29, 30, 32, 34, 35, 36–39].

**Апробація результатів дисертації.** Результати досліджень, викладені в дисертаційній роботі, представлені й обговорювалися на 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39-й Міжнародних конференціях молодих вчених «Холод в біології і медицині» (Харків, 2009–2015 рр.); IV і V Міжнародній конференції молодих науковців «Біологія: від молекули до біосфери» (Харків, 2009, 2011); науково-практичній конференції з міжнародною участю, присвяченій 90-річчю кафедри інфекційних хвороб Харківського національного університету (Харків, 2013); VII Міжнародній науковій конференції «Современное состояние и перспективы развития микробиологии и биотехнологии» (Білорусь, Мінськ, 2010); Міжнародній конференції «Криоконсервация генетических ресурсов. Современное состояние, проблемы и перспективы» (Росія, Пушино, 2014); IV південно-українській науково-практичній конференції «Фундаментальні проблеми внутрішньої медицини – від молекули до практичного одужання» (Одеса, 2011); Міжнародній науково-практичній конференції «Сучасні проблеми світової медицини та її роль у забезпеченні здоров'я світового товариства», (Одеса, 2012); 6-й Об'єднаній науковій сесії і 2-му Міжнародному конгресі з пробіотиків «Санкт-Петербург-Пробиотики-2009» (Росія, Санкт-Петербург, 2009); Українській науково-практичній конференції з міжнародною участю «Нове у діагностиці, лікуванні і профілактиці імуно- та алергопатологій» (Львів, 2009); Українських науково-практичних конференціях з міжнародною участю «Сучасні теорія та практика клінічної імунології та алергології (Київ, 2010–2012 рр.); Міжнародній науковій конференції студентів та молодих

вчених «Актуальні питання сучасної медицини» (Харків, 2009, 2010, 2011, 2012, 2013 рр.); Міжнародній науково-практичній конференції «Теоретические и практические аспекты современной криобиологии» (Росія–Україна, Сиктивкар, 2014); 52nd Annual Meeting of the Society for Cryobiology CRYO2015 (Ostrava, Czech Republic); International Conference and Exhibition on Tissue Preservation and Bio-banking (Barcelona, Spain, 2015).

**Публікації.** Основні результати дисертації опубліковано у 39 наукових працях: 6 – у спеціалізованих наукових виданнях України, 2 – у закордонних наукових журналах, 28 тез доповідей, з яких 4 – закордоном, у главі в колективній монографії, отримано 2 патенти України.

**Обсяг і структура дисертації.** Дисертація складається із вступу, основної частини, в яку входить три розділи (огляд літератури, матеріали і методи дослідження, отримані результати і їх обговорення), заключення, висновків. Повний обсяг дисертації 201 сторінка, обсяг основного тексту 166 сторінок. Дисертація містить 63 рисунки, 5 таблиць, 4 додатки. Список використаних джерел містить 430 найменувань.

## ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

### Матеріали і методи дослідження

Дослідження були виконані з пробіотичними штамами бактерій *Bifidobacterium bifidum* ЛВА-3 (*B. bifidum*) (ВКПМ «ДержНДІ Генетика», РФ), *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* (*L. bulgaricus*) (філія ФДБНУ «НДІ хлібопекарної промисловості», Санкт-Петербург, РФ) та дріжджами *Saccharomyces cerevisiae var. boulardii* (*S. boulardii*) в складі «Ентерол» («Biocodex», Франція).

Життєздатність вільних клітин визначали «чашковим» методом Коха (Textbook of Microbiology, 2009). Збереженість комплексів «носії-клітини» визначали за методом, розробленим під час виконання роботи (Патент України №72110). Принцип методу полягає у звільненні зразків від вільних клітин за допомогою центрифугування в пробірках із вмонтованими мембранами і проведенні серійних розведень у 0,2% гелі агару з наступним висівом комплексів в агаризовані середовища. Підраховували кількість макроколоній, сформованих комплексами.

Програмне заморожування зразків проводили в заморожувачі біооб'єктів «Cryoson BV-6» (Німеччина). На першому етапі зразки заморожували із різними швидкостями охолодження до -40°C, потім занурювали в рідкий азот. Адсорбційну здатність (АЗ) сорбентів оцінювали за сорбцією метиленового синього («Макрохим», РФ), сироваткового альбуміну («Baxter, AG», Швейцарія) та мікробних клітин (Єрецький Є. Л., 2001; Решетников В. И., 2003; Маркелов Д. А. та ін., 2008). Дослідження проводили з наступними ентеросорбентами: активоване вугілля («Стома», Україна), «Сорбекс» («Екосорб», Україна), «СУМС-1» («Новосибхимфарм», РФ), «Ліферан» («Орсил-Фарм», РФ), «Лактофільтрум» («Лексир», РФ), «Мультисорб» («Аріадна», Україна), «Атоксил» («Фетида», Україна).

Антагоністичну активність мікроорганізмів вивчали за методом двошарового середовища з визначенням мінімальної інгібуючої концентрації антагоніста (Лазовская А. Л. та ін., 2008; Ермоленко Е. И., 2009). Чутливість мікроорганізмів до

антибіотиків реєстрували за диско-дифузійним методом Keurby-Bauer (Наказ МОЗ України №167 від 05.04.2007), до шлункового соку – за методами, описаними в роботах (Lee K. Y. et al, 2000; Martius F. S. et al, 2008; Lik J. et al., 2008), до солей жовчі – за методами, описаними в дослідженнях (Errikla E. E., 2000; Sharaf A. N. et al., 2009). Цукролітичні властивості вивчали за методами, описаними в роботах (Поліщук О. І., Колтунова Н. В., 2000; R. Reyed, 2006; Степонов К. М., 2009).

Експериментальний хіміотерапевтичний дисбіоз кишечника викликали у лабораторних щурів і мишей внутрішньошлунковим введенням ампіциліну і метронідазолу протягом 3 діб (Ермоленко Е. И. и др., 2009). Імуносупресію у мишей формували підшкірним введенням гідрокортизону ацетату (Патент РФ №2279721). Терапію експериментального дисбіозу проводили внутрішньошлунковим введенням пробіотичних препаратів протягом 12 діб. У першій і другій серії дослідів тварин було поділено на 10 груп. У кожній групі корекцію дисбіозу проводили наступними препаратами: 1 – вільні клітини пробіотика; 2 – кріоконсервовані вільні клітини пробіотика; 3 – нативні комплекси «СУМС-1»-клітини»; 4 – кріоконсервовані комплекси «СУМС-1»-клітини»; 5 – нативні комплекси «Сорбекс»-клітини»; 6 – кріоконсервовані комплекси «Сорбекс»-клітини»; 7 – суміш вільних клітин пробіотика та «СУМС-1»; 8 – суміш вільних клітин пробіотика та «Сорбекс»; 9 – «СУМС-1»; 10 – «Сорбекс» (рис. 10). Контролем були інтактні тварини. В третій серії експериментів тварин із дисбіозом було поділено на 15 груп. В першій та третій серії експериментів на кожному етапі спостереження забивали по 5 тварин із кожної групи. Усі маніпуляції проводили відповідно до «Загальних принципів експериментів на тваринах» (2001).

Якісний та кількісний склад мікрофлори кишечника і внутрішніх органів проводили за загальноприйнятими методами. Препарати муцину товстої кишки виділяли за методикою (Воробьев А. А. та ін., 2001), фарбували за Грамом і Романовським-Гімзою (Королюк А. М., Сбойчаков В. Б., 2002) та додатково наносили 1% агаровий гель для фіксації гранул ентеросорбентів (Морозов И. А., 1999). Досліджували препарати муцину за допомогою мікроскопа «Zeiss Primo Star» (Німеччина) з програмним забезпеченням «AxioVision 4.0», (Німеччина).

РЕМ клітин дріжджів проводили за допомогою мікроскопа РЕММА-101 А (АТ «Selmi», Україна) з програмною обробкою зображення (НКФ «SEO Image Lab», Україна). Вільні та іммобілізовані клітини фіксували глютаральдегідом із наступним напленням сріблом. ЛМ дріжджових клітин виконували за допомогою мікроскопа LSM 510 META («Carl Zeiss», Німеччина). Мертві клітини з пошкодженою цитоплазматичною мембраною фарбували йодидом пропідію (ЙП) («Sigma-Aldrich», США), який зв'язується з нуклеїновими кислотами.

Статистичний аналіз отриманих результатів проводили з використанням статистичної програми «SPSS 15.0», («IBM», США).

### **Результати досліджень та їх обговорення**

Показано, що ефективність іммобілізації мікробних клітин на ентеросорбентах залежить від хімічного складу сорбенту, температури і тривалості сорбції, співвідношення кількості клітин до маси сорбенту. Показники сорбції мікробних клітин на ентеросорбентах «Сорбекс», «СУМС-1» за всіх умов експерименту були



достовірно вищими в порівнянні з іншими сорбентами. Експериментально визначено умови найбільш ефективної іммобілізації клітин *S. boulardii*, *B. bifidum*, *L. bulgaricus* на сорбентах «Сорбекс» і «СУМС-1»: погойдування на качалці ( $\approx 75$  обертів платформи на хв) 30–60 хв при  $0 \dots 2^\circ\text{C}$  та співвідношення  $10^7$  клітин на 1 г сорбенту.

Під час вивчення препаратів іммобілізованих *S. boulardii* за допомогою РЕМ було встановлено, що морфологія вільних та іммобілізованих клітин після заморожування до  $-196^\circ\text{C}$  не змінювалася (рис. 1). Одна частина клітин адгезувала безпосередньо до поверхні носіїв, інша – проникла на різну глибину в макропори матеріалу носіїв. Кількість клітин у різних ділянках поверхні носіїв відрізнялася.

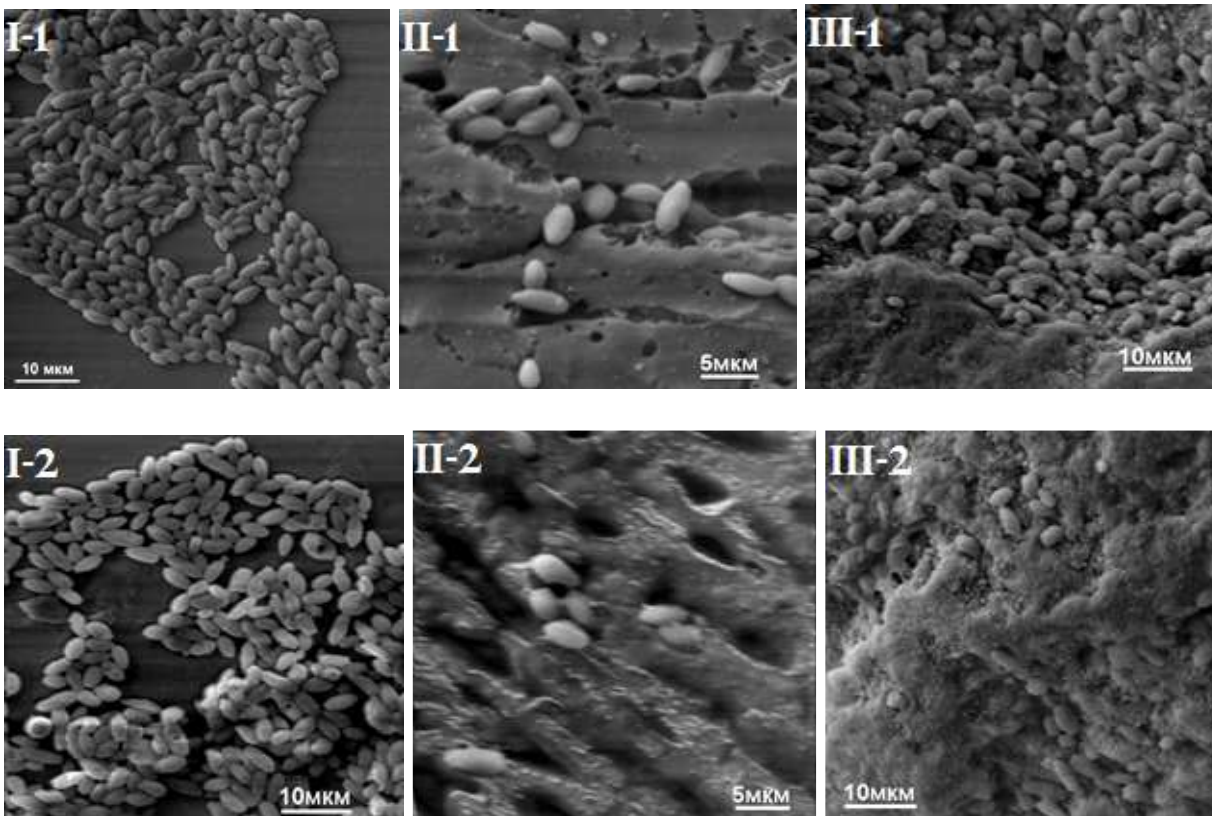


Рис. 1. Електронोगрами препаратів вільних (I) та іммобілізованих на препаратах «Сорбекс» (II) та «СУМС-1» (III) клітин *S. boulardii* до (1) та після (2) заморожування до  $-196^\circ\text{C}$ .

За допомогою ЛМ встановлено, що на поверхні носіїв знаходиться різна кількість пошкоджених клітин із включенням ЙП. Одночасно разом із комплексами в препаратах виявляли вільні неушкоджені клітини і клітини з включенням ЙП (рис. 2). Так як під час оцінки збереженості препаратів іммобілізованих на носіях мікроорганізмів за загальноприйнятим варіантом постановки «чашкового» методу Коха враховують сумарну кількість макроколоній, сформованих як комплексами «носій-клітини», так і вільними клітинами, що знаходяться в препаратах, нами було розроблено метод оцінки збереженості тільки ізольованих комплексів, який представлено в розділі «Матеріали і методи досліджень».

Було проведено порівняльне вивчення впливу умов кріоконсервування на життєздатність вільних клітин та збереженість комплексів «носії-клітини». Встановлено, що іммобілізовані клітини пошкоджувалися під час заморожування більшою мірою, ніж вільні. На збереженість комплексів, як і на життєздатність вільних клітин, впливали вихідна кріорезистентність клітин, склад середовищ консервування, швидкість охолодження, а також вид матеріалу носія. Найбільш чутливими до заморожування були комплекси із іммобілізованими клітинами *S. boulardii*. Ці результати повною мірою відповідають положенням класичної двофакторної теорії кріоушкоджень біологічних об'єктів (Mazur P., Chu E. H. Y., 1972). Максимальні показники збереженості комплексів «СУМС-1»–дріжджові клітини» були після заморожування у фізіологічному розчині, 5% розчинах ДМСО і сахарози зі швидкістю на першому етапі 1град/хв, у пивному суслі – зі швидкостями 1, 10 град/хв. (рис. 3), а комплексів «Сорбекс»–дріжджові клітини» – у всіх вказаних консервуючих середовищах після заморожування зі швидкістю 1град/хв.

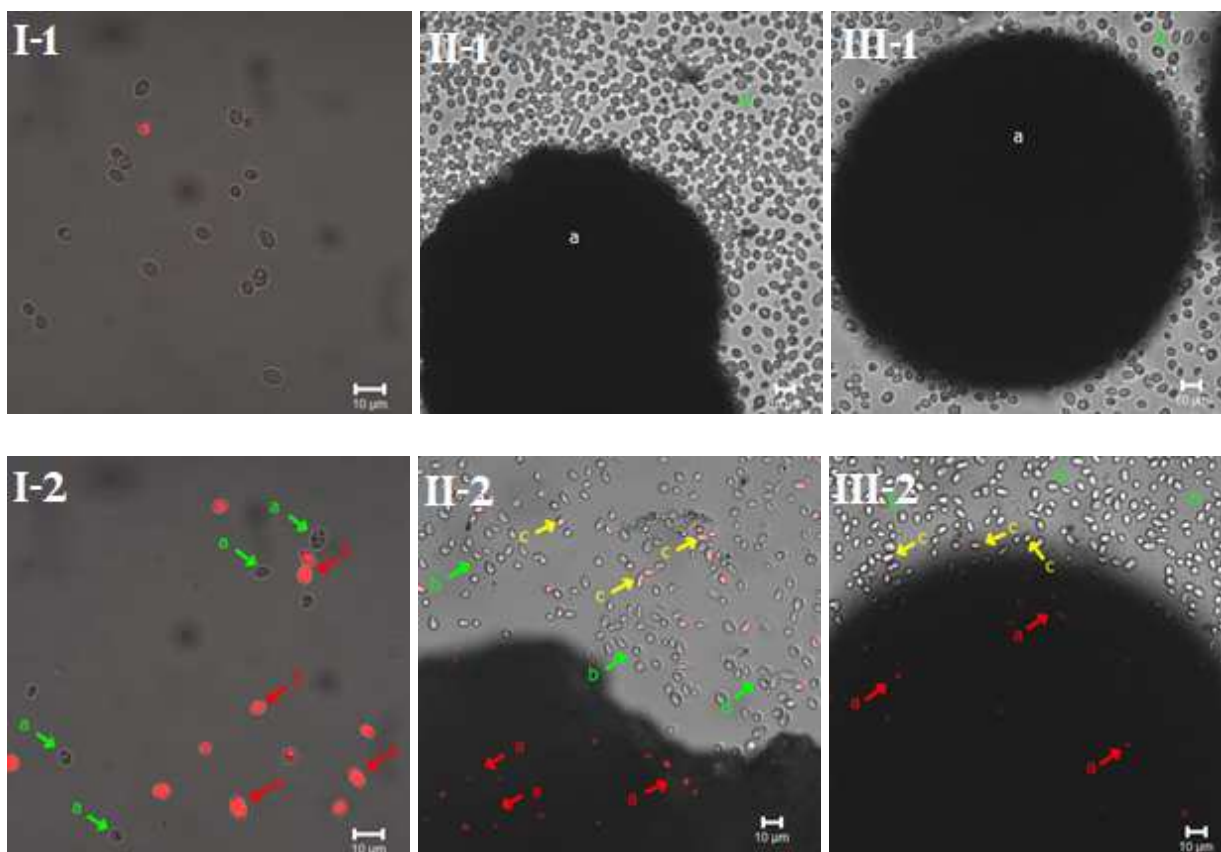


Рис. 2. ЛМ препаратів вільних (I) та іммобілізованих на препаратах «Сорбекс» (II) та «СУМС-1» (III) клітин *S. boulardii* до (1) та після (2) заморожування до – 196°C: а – іммобілізовані клітини з ЙП; б – непошкоджені вільні клітини; с – вільні клітини з включенням ЙП.

Максимальні показники збереженості комплексів клітин *B. bifidum*, *L. bulgaricus*, іммобілізованих на препаратах «Сорбекс» і «СУМС-1», були після заморожування в 5% розчині сахарози, середовищі МРС-Ц (HiMedia Laboratories Pvt. Ltd, Мумбаї, Індія), фізіологічному розчині, знежиреному молоці з доданням 5% сахарози зі швидкістю 1град/хв.

Загибель більшої кількості мікробних клітин, іммобілізованих на носіях, найбільш вірогідно пов'язана з тим, що частина поверхні клітин тісно контактує зі структурами сорбентів. У результаті цього об'єм клітин зберігається, але поверхня клітин, яка бере участь у транспорті води, зменшується. Це призводить до посилення процесів внутрішньоклітинної кристалізації при заданій швидкості охолодження. Не виключено, що під час охолодження на етапі позаклітинної кристалізації, коли здійснюється транспорт води із клітин і об'єм клітин зменшується, на межовій зоні зафіксованої ділянки клітинної поверхні додатково пошкоджуються цитоплазматична мембрана та клітинна стінка.

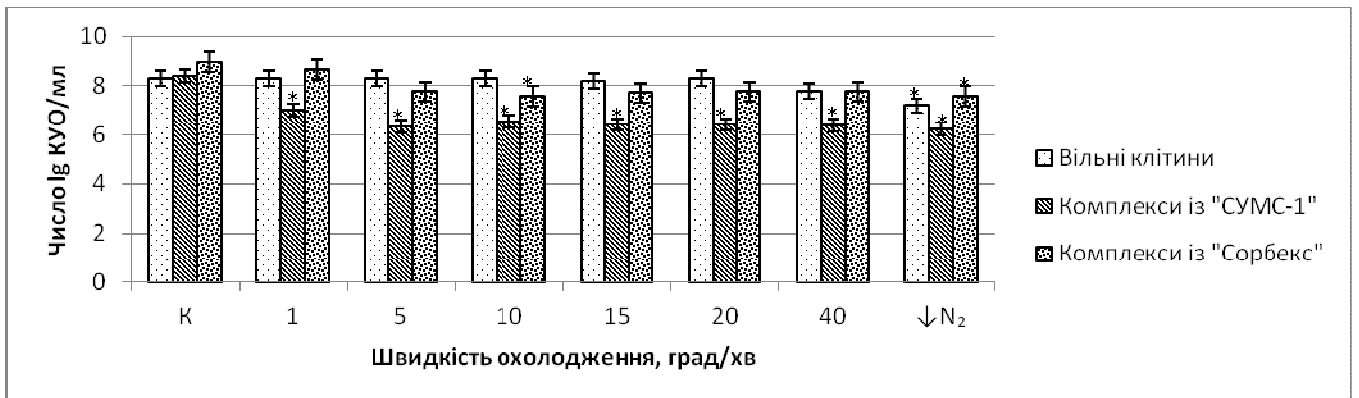


Рис. 3. Життєздатність вільних клітин *S. boulardii* та збереженість комплексів із препаратами «Сорбекс» і «СУМС-1» після заморожування до  $-196^{\circ}\text{C}$  за різними програмами в 5% розчині сахарози, К – контроль, \* –  $p < 0,05$  порівняно з контролем.

У подальших експериментах було вивчено збереженість вільних та іммобілізованих клітин пробіотиків протягом року (термін спостереження) при температурах 4,  $-20$ ,  $-80$ ,  $-196^{\circ}\text{C}$ . Середовищем консервування був 5% розчин сахарози. Під час зберігання дріжджів за температур 4- $20^{\circ}\text{C}$  кількість життєздатних вільних клітин і збережених комплексів «носій-клітини» понижувалися протягом року (рис. 4). При цьому комплекси «СУМС-1»-*S. boulardii* загинули за температури  $4^{\circ}\text{C}$  між 6 і 12 місяцями зберігання.



Рис. 4. Життєздатність вільних клітин *S. boulardii* та збереженість комплексів після зберігання протягом року за різних температур: К – вихідний контроль. \* –  $p < 0,05$  порівняно з контролем, # –  $p < 0,05$  при порівнянні різних термінів зберігання.

Під час зберігання за  $-80^{\circ}\text{C}$  кількість вільних клітин і комплексів з «Сорбекс» і «СУМС-1» через 366 діб знизилася. У процесі зберігання при  $-196^{\circ}\text{C}$  вільні клітини *S. boulardii* не загинули. Кількість комплексів зменшувалася тільки на етапах заморожування-відтаювання. При подальшому зберіганні за  $-196^{\circ}\text{C}$  збереженість комплексів не змінювалася.

У дослідях зі зберігання як за 4, так і за  $-20^{\circ}\text{C}$  кількість клітин бактерій *B. bifidum* та їх комплексів з «Сорбекс» і «СУМС-1» зменшувалася (рис. 5). Після зберігання за  $-80^{\circ}\text{C}$  кількість життєздатних вільних клітин та комплексів протягом 191 доби не змінювалася. Через рік кількість вільних клітин, комплексів із носієм «Сорбекс» і «СУМС-1» зменшилася. У процесі зберігання при  $-196^{\circ}\text{C}$  вільні клітини та комплекси з «Сорбекс», не гинули. Кількість комплексів з «СУМС-1», знизилася на етапах заморожування-відтаювання. Додаткові пошкодження комплексів у процесі зберігання протягом року не виникали.

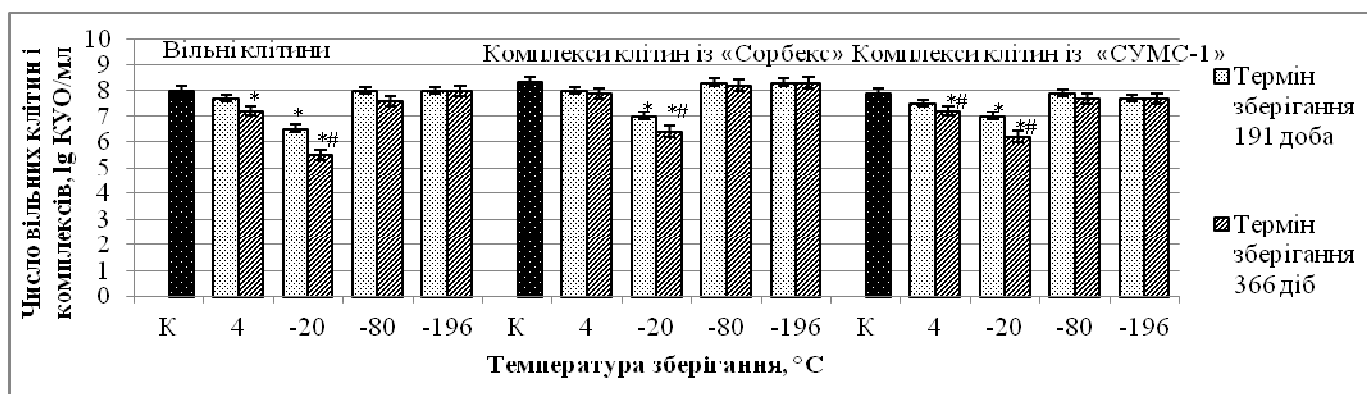


Рис. 5. Життєздатність вільних клітин *B. bifidum* та збереженість комплексів після зберігання протягом року при різних температурах. \* –  $p < 0,05$  при порівнянні із контролем, # –  $p < 0,05$  при порівнянні різних термінів зберігання.

У дослідях із бактеріями *L. bulgaricus* після зберігання протягом року за 4,  $-20^{\circ}\text{C}$  кількість життєздатних вільних клітин, комплексів із носієм «Сорбекс» і «СУМС-1» знизилася (рис. 6). При температурі  $-80^{\circ}\text{C}$  вільні клітини та клітини, іммобілізовані на «Сорбекс», протягом року не гинули. Комплекси із носієм «СУМС-1» гинули з 191 доби зберігання. Під час зберігання при  $-196^{\circ}\text{C}$  вільні та іммобілізовані на препараті «Сорбекс» клітини *L. bulgaricus* не гинули. Кількість комплексів із носієм «СУМС-1» дещо зменшилася, їх загибель відбувалася також на етапах заморожування-відтаювання.

Обов'язковими вимогами до комерційних препаратів пробіотиків є гарантована збереженість після максимального терміну зберігання кількості життєздатних клітин, яка чинить терапевтичний ефект, біологічних властивостей, від яких залежить терапевтична дія пробіотиків, та здатність до колонізації або персистенції. В модельних експериментах *in vitro* було встановлено, що іммобілізація на ентеросорбентах та зберігання при температурах  $-80$ ,  $-196^{\circ}\text{C}$  не впливали на резистентність пробіотиків до шлункового соку, антибіотиків, спектри

антагоністичної і цукролітичної активності. У комплексів іммобілізованих клітин була більш високою резистентність до солей жовчі.

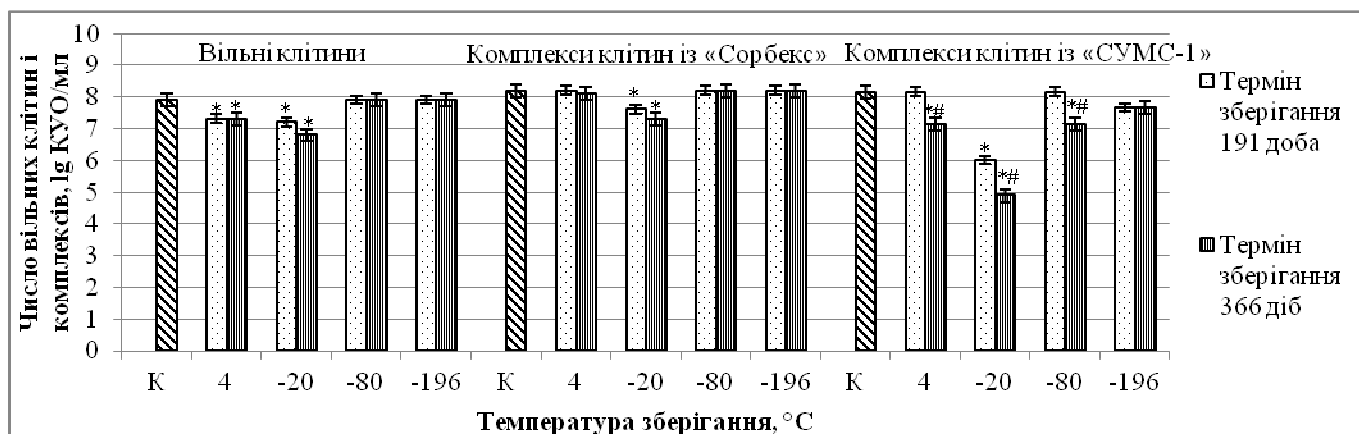


Рис. 6. Життєздатність вільних клітин *L. bulgaricus* та збереженість комплексів після зберігання протягом року при різних температурах; К – вихідний контроль; \* –  $p < 0,05$  порівняно із контролем, # –  $p < 0,05$  при порівнянні різних термінів зберігання.

Інтегральною характеристикою здатності пробіотиків до колонізації слизової оболонки або до персистенції в муцині є корекція дисбіоза кишечника із відновленням нормальної мікрофлори та зникненням клінічних проявів порушень травної функції ШКТ та порушень імунної системи.

Було проведено три серії експериментів із дослідження терапевтичної дії пробіотиків після іммобілізації на ентеросорбентах та наступного зберігання за низьких температур. У першій серії експериментів вивчали відновлення кишкової мікрофлори та ерадикацію транслокованих у внутрішні органи мікроорганізмів імуносупресованих мишей із хіміотерапевтичним дисбіозом кишечника (рис. 7).

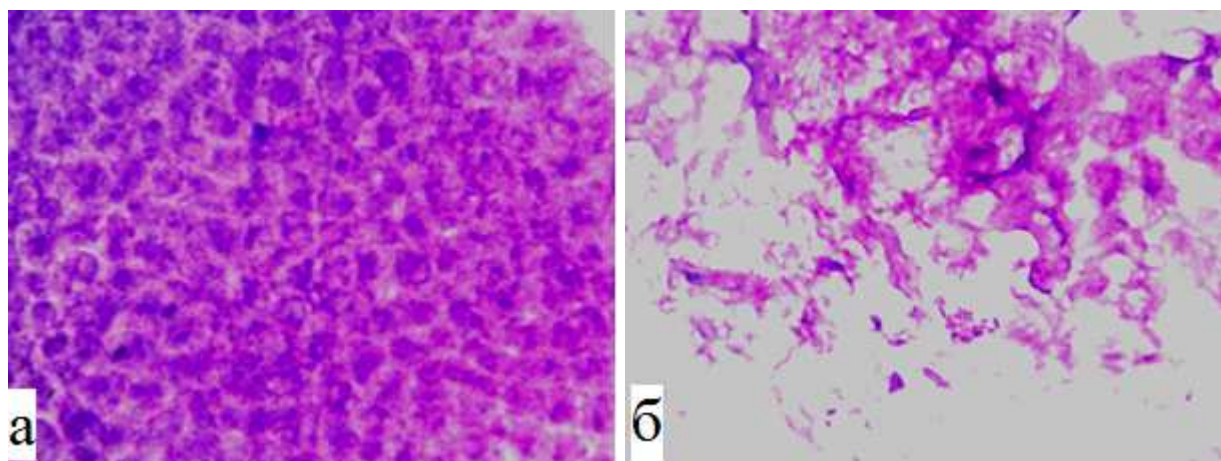


Рис. 7. Муцин товстої кишки мишей: а – до індукції дисбіозу; б – дисбіоз. x400.

Ці дослідження проводили із пробіотиком *S. boulardii*, який не здатний до колонізації кишечника теплокровних тварин. Його терапевтична дія виявляється протягом терміну прийому препарату та персистенції клітин дріжджів у кишечнику (McFarland L. V., 2009). Було показано, що найбільш швидке відновлення

мікрофлори товстої кишки та ерадикація транслокованих мікроорганізмів із внутрішніх органів відбувалися в групах мишей, які отримували нативні і кріоконсервовані препарати іммобілізованих *S. boulardii* (рис. 8). У другій серії експериментів вивчали терапевтичну дію іммобілізованих клітин *S. boulardii* при експериментальному хіміотерапевтичному дисбіозі у білих лабораторних щурів. Було встановлено, що мікрофлора товстої кишки дослідних тварин також найбільш швидко та в повному обсязі відновлювалася після прийому препаратів іммобілізованого пробіотика. Різниці в терапевтичній дії нативних і кріоконсервованих комплексів «носії-клітини» не виявлено.

У третій серії експериментів вивчали корекцію пристінкових популяцій ценобіонтів *Bifidobacterium spp.*, *Lactobacillus spp.* у мишей із експериментальним дисбіозом кишечника без імуносупресії після терапії вільними та іммобілізованими на ентеросорбентах пробіотиками, які зберігалися протягом року за  $-80$  і  $-196^{\circ}\text{C}$  у 5% розчині цукрози. У тварин контрольної групи, яким не проводили лікування, протягом всього періоду спостережень відмічали клінічні прояви дисбіозу кишечника. Після індукції дисбіозу вміст біфідо- і лактобактерій у муцині товстої кишки знизився, відповідно, із 7,4 і 81, до 2,0 і 2,3 ІгКУО/г. Через 22 доби (термін спостереження) в муцині тварин контрольної групи вміст біфідобактерій і лактобактерій підвищився, відповідно, до 4,0 і 3,8 ІгКУО/г. В групах тварин, які отримували препарати вільних клітин *B. bifidum* і *L. bulgaricus* і суміші вільних клітин з ентеросорбентами через 10 діб після закінчення курсу лікування вміст біфідо- і лактобактерій підвищився, відповідно, до 5,4-5,6 і 5,7-5,9 та 7,0-7,2 і 7,3-7,5 ІгКУО/г.

В групах тварин, які отримували іммобілізовані на ентеросорбентах *B. bifidum*, *L. bulgaricus*, вміст в муцині *Bifidobacterium spp.* *Lactobacillus spp.* відновився на 12 добу прийому препаратів.

В усіх експериментальних групах тварин розбіжності у показниках відновлення в муцині сумарних чисел *Bifidobacterium spp.* та *Lactobacillus spp.* після прийому нативних і тих, які зберігалися протягом року при температурах  $-80$ ,  $-196^{\circ}\text{C}$ , вільних та іммобілізованих на ентеросорбентах клітин *B. bifidum* і *L. bulgaricus* були відсутні. У тварин, яких лікували препаратами *S. boulardii*, після індукції дисбіозу вміст біфідо- та лактобактерій в муцині понизився, відповідно, з 7,6 до 2,1 та з 8,0 до 2,4 ІгКУО/г. У групах тварин, яким проводили лікування препаратами вільних клітин *S. boulardii* та сумішами вільних клітин із ентеросорбентами, дріжджові клітини висівали на 5 добу після закінчення курсу терапії, у тварин, яким вводили іммобілізовані дріжджі, – через 10 діб після закінчення прийому препаратів. Через 10 діб після закінчення курсу лікування препаратами вільних клітин *S. boulardii* вміст в муцині *Bifidobacterium spp.* і *Lactobacillus spp.* підвищився, відповідно, 4,3-4,5 та 4,8-4,9 Іг КУО/г. Після лікування сумішами вільних дріжджових клітин з ентеросорбентами – до 4,9-5,0 та 5,2-5,4 Іг КУО/г. Після лікування іммобілізованими *S. boulardii* – до 5,3-5,4 та 5,9-6,2 Іг КУО/г. Значущі розбіжності щодо здатності іммобілізованих і вільних клітин *S. boulardii* сприяти збільшенню в муцині тварин із дисбіозом кишечника популяцій *Bifidobacterium spp.* і *Lactobacillus spp.* після зберігання при температурі  $-80$ ,  $-196^{\circ}\text{C}$  були відсутні.

Під час мікроскопії препаратів муцину товстої кишки також було зафіксовано збільшення кількості біфідо- або лактобактерій на 12 добу та після курсу дисбіозом. \* –  $p < 0,05$  порівняно з контролем.

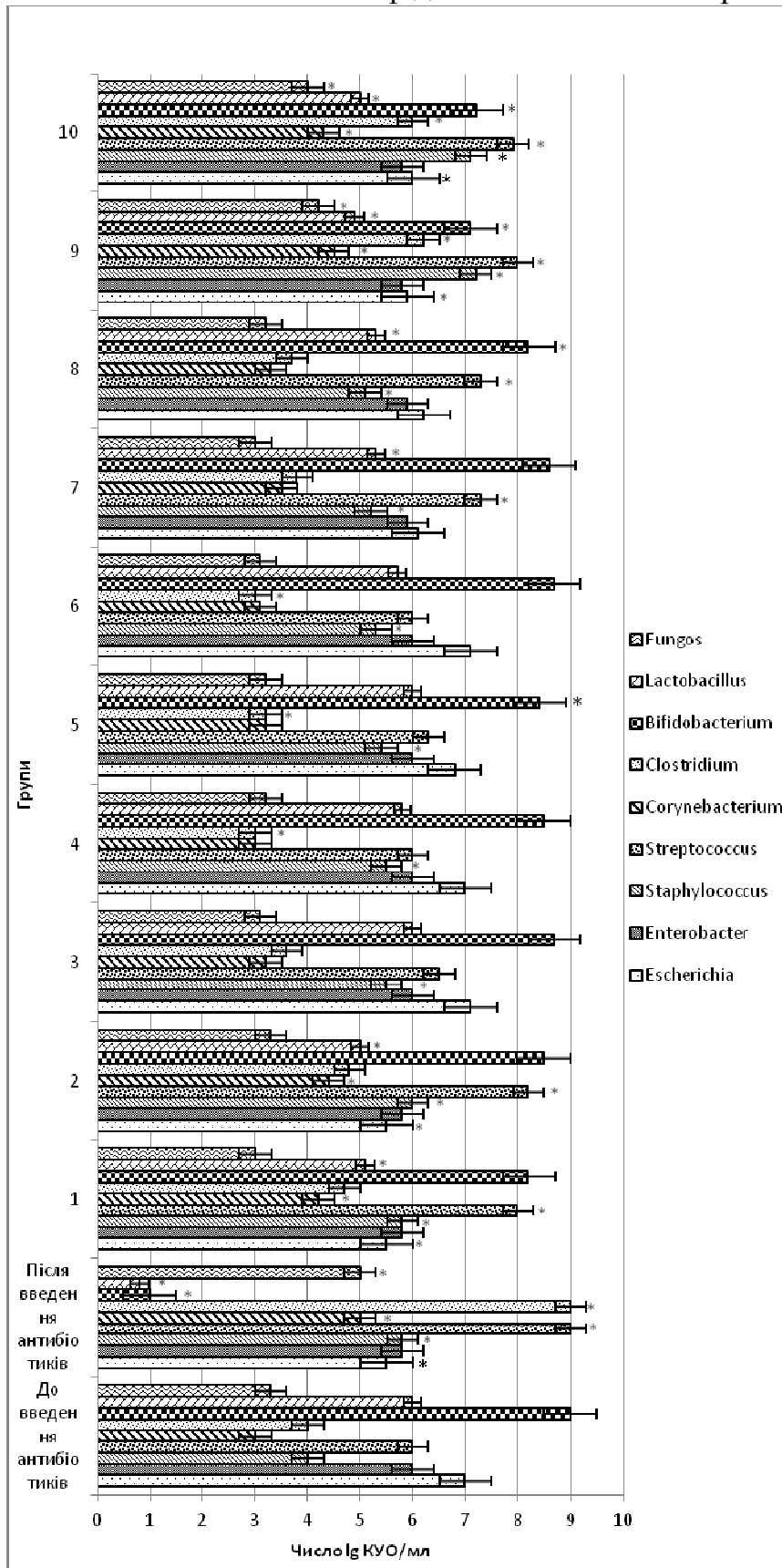


Рис. 8. Відновлення індигенної мікрофлори кишечника у імуносупресованих мишей з

терапії В муцині тварин, які отримували суміші вільних клітин із ентеросорбентами та іммобілізованих пробіотики, до закінчення терміну спостережень були присутні гранули ентеросорбентів (рис. 9). З динамікою відновлення в муцині кількості біфідо- та лактобактерій корелювало зменшення клінічних проявів порушень травних функцій ШКТ.

Результати експериментів із вивчення відновлення просвітної та пристінкової мікрофлори кишечника тварин із експериментальним дисбіозом свідчать про те, що препарати іммобілізованих на ентеросорбентах пробіотиків виявляють більш виражену терапевтичну дію в порівнянні з препаратами вільних клітин та сумішей вільних клітин із ентеросорбентами. Найбільш імовірний наступний механізм терапевтичної дії іммобілізованих пробіотиків. Частиці сорбентів-носіїв адгезують до пристінкового шару слизової оболонки кишечника.

Результати експериментів із вивчення відновлення просвітної та пристінкової мікрофлори кишечника тварин із експериментальним дисбіозом свідчать про те, що препарати іммобілізованих на ентеросорбентах пробіотиків виявляють більш виражену терапевтичну дію в порівнянні з препаратами вільних клітин та сумішей вільних клітин із ентеросорбентами. Найбільш імовірний наступний механізм терапевтичної дії іммобілізованих пробіотиків. Частиці сорбентів-носіїв адгезують до пристінкового шару слизової оболонки кишечника.

За рахунок поступової десорбції мікробних клітин із носія відбувається колонізація прилеглих ділянок пристінкового шару слизової *B. bifidum* і *L. bulgaricus* або більш тривала персистенція *S. boulardii*. Привнесені клітини пробіотиків та детоксикаційна функція ентеросорбентів сприяють відновленню популяцій пристінкових ценобіонтів, очевидно, за рахунок резидентної мікрофлори. На користь цього свідчить виражена лікувальна дія іммобілізованого транзитного пробіотику *S. boulardii*. Зберігання за температур  $-80$ ,  $-196^{\circ}\text{C}$  не впливає на терапевтичний ефект вільних та іммобілізованих клітин пробіотиків.

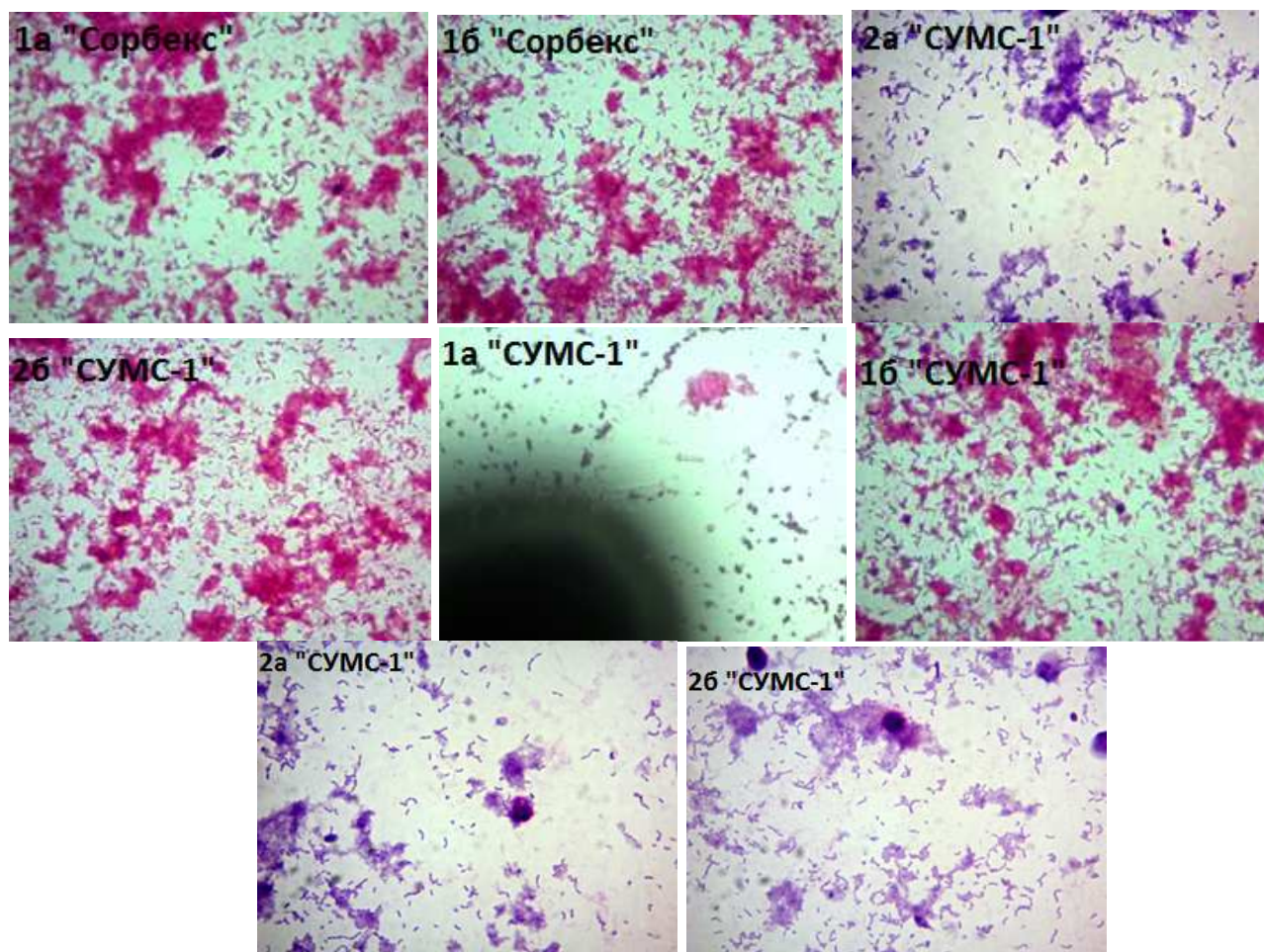


Рис. 9. Терapiя препаратами клітин *B. bifidum* (1) і *L. bulgaricus* (2), іммобілізованими на ентеросорбентах, після зберігання при  $-80^{\circ}\text{C}$ : а – 12 доба терапії; б – через 10 діб після закінчення терапії.  $\times 400$ .

## ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі представлено теоретичне узагальнення і нове вирішення наукової задачі, спрямоване на обґрунтування умов довгострокового зберігання препаратів пробіотиків, іммобілізованих на ентеросорбентах.

1. Показники сорбції мікробних клітин на ентеросорбентах «Сорбекс», «СУМС-1» за всіх умов експерименту були достовірно вищими в порівнянні з іншими сорбентами. Експериментально визначено умови іммобілізації пробіотиків *S. boulardii*, *B. bifidum*, *L. bulgaricus* на сорбентах на основі активованого вугілля «Сорбекс», «СУМС-1»: погойдування на качалці ( $\approx 75$  обертів платформи на



хвилину) при температурі 0–2°C впродовж 30–60 хв та співвідношення  $10^7$  клітин/г сорбенту.

2. Виявлено, що під час оцінки збереженості препаратів іммобілізованих на сорбентах клітин за здатністю до колонієутворення на/в ростових середовищах макроколонії формують і комплекси «носій-клітини», і вільні неіммобілізовані клітини та клітини, які десорбували з носіїв під час відтаювання та маніпуляцій. Розроблено спосіб визначення збереженості комплексів «носій-клітини» (Патент України 72110).

3. В процесі кріоконсервування іммобілізованих на ентеросорбентах «СУМС-1», «Сорбекс» дріжджів *S. boulardii* максимальні показники збереженості комплексів були після охолодження на першому етапі зі швидкістю 1 град/хв з використанням захисних середовищ: 5% розчинів сахарози і ДМСО, пивного суслу, фізіологічного розчину. Максимальні показники збереженості комплексів клітин *B. bifidum*, *L. bulgaricus* були після заморожування в 5% розчині сахарози, середовищі МРС-Ц, фізіологічному розчині, знежиреному молоці з доданням 5% сахарози зі швидкістю охолодження 1 град/хв. для *B. bifidum* та 1-10 град/хв – для *L. bulgaricus*. Ці режими кріоконсервування доцільно використовувати під час низькотемпературного зберігання іммобілізованих на ентеросорбентах пробіотиків.

4. Іммобілізація на ентеросорбентах та наступне кріоконсервування не викликали у пробіотиків змін антагоністичної активності по відношенню до патогенних і умовно-патогенних мікроорганізмів, спектрів чутливості до антибіотиків, спектрів цукролітичної активності, чутливості до соляної кислоти. Комплекси «носій-клітини» до і після кріоконсервування були більш резистентні до жовчних кислот, ніж у вільні клітини.

5. Температури зберігання -80...-196°C забезпечували протягом року збереженість репродуктивних доз іммобілізованих пробіотиків. У зразках *S. boulardii*, іммобілізованих на «Сорбекс», кількість КУО/мл знизилася з 7,9 lg при -80°C на 1,68 lg, при -196°C – на 0,5 lg. Кількість комплексів «*S. boulardii*-СУМС-1» при -80°C знизилася з 7,3 lg на 1,4 lg, при -196°C – на 1,1 lg. У зразках *B. bifidum*, іммобілізованих на «Сорбекс» і «СУМС-1», кількість КУО/мл при -80°C знизилася, відповідно, з 8,3 lg на 0,1 lg та з 7,9 lg на 0,2 lg. При -196°C іммобілізовані *B. bifidum* не гинули. Комплекси «*L. bulgaricus* – «Сорбекс» при температурах -80...-196°C не гинули. Кількість комплексів «*L. bulgaricus* – «СУМС-1» знизилася при -80°C і -196°C, відповідно, з 8,15 lg на 1,0 lg та 0,5 lg. У разі зниження кількості комплексів у зразках, що зберігалися при -196°C, їх руйнування відбувалося лише на етапах заморожування-відтаювання. На відміну від наведених режимів зберігання при температурах 4°C, -20°C було неефективним: іммобілізовані пробіотики гинули протягом всього терміну зберігання.

6. Встановлено, що під час корекції експериментального хіміотерапевтичного дисбіозу у лабораторних тварин терміни відновлення мікрофлори товстої кишки та ерадикації із внутрішніх органів транслокованої мікрофлори після введення іммобілізованих на ентеросорбентах пробіотиків достовірно скорочувалися в порівнянні з препаратами вільних клітин пробіотиків, ентеросорбентів та сумішей вільних клітин з ентеросорбентами. Довгострокове зберігання при -80 і -196°C не впливало на вираженість терапевтичної дії

імобілізованих пробіотиків. Розроблено спосіб корекції дисбіозу кишечника (Патент України №76142).

### ПЕРЕЛІК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ

1. Высеканцев И. П. Сохранность биологических свойств иммобилизованных пробиотиков после криоконсервирования / И. П. Высеканцев, О. М. Бабинец, В. Ф. Марценюк, Л. Е. Шатилова : Материалы VII Междунар. науч. конф. «Современное состояние и перспективы развития микробиологии и биотехнологии», – Минск, 2010. – С. 102–103.
2. Высеканцев И. П. Сравнительное изучение адсорбции стандартных маркеров и пробиотиков *Saccharomyces boulardii* и *Bifidobacterium bifidum* на энтеросорбентах / И. П. Высеканцев, О. М. Бабинец, В. Ф. Марценюк, Л. Е. Шатилова // Вісник проблем біології і медицини. – 2011, Вип. 1. – С.58–62.
3. Бабинец О. М. Оценка свойств пробиотиков, иммобилизованных на энтеросорбентах, после низкотемпературного хранения / О. М. Бабинец // Вісник проблем біології і медицини. – 2012, Вип. 3. – Т.2. – №95. – С. 48–54.
4. Бабинец О. М. Коррекция экспериментального дисбиоза препаратами пробиотиков, иммобилизованных на энтеросорбентах, после их низкотемпературного хранения / О. М. Бабинец // Вісник проблем біології і медицини. – 2012 – Вип. 4. – Т.1. – №96. – С. 72–78.
5. Высеканцев И. П. Сравнительное изучение влияния режимов криоконсервирования на свободные и иммобилизованные клетки пробиотика *Saccharomyces boulardii* / И. П. Высеканцев, О. М. Бабинец, В. Ф. Марценюк, Т. М. Гурина // Проблеми кріобіології і кріомедицини. – 2012. – Т.22, №1. – С.21–29.
6. Гурина Т. М. Стандартизация процесса криоконсервирования дрожжей *Saccharomyces boulardii* для использования в коллекциях и банках промышленных штаммов микроорганизмов / Т. М. Гурина, И. П. Высеканцев, О. М. Бабинец // Мікробіолог. журнал. – 2013. – Т. 75, № 5. – С. 33–39.
7. Бабинец О. М. Долгосрочное хранение пробиотиков, иммобилизованных на сорбентах, при низких температурах / О. М. Бабинец, И. П. Высеканцев, В. Ф. Марценюк // Биофизика живой клетки (Консервация генетических ресурсов). – 2014. – Т.10. – С. 39–41.
8. Высеканцев И. П. Коррекция популяций ценобионтов *Bifidobacterium spp.* и *Lactobacillus spp.* у мышей с экспериментальным дисбиозом кишечника после терапии иммобилизованными на энтеросорбентах пробиотиками, хранившимися при –80 и –196°C / И. П. Высеканцев, О. М. Бабинец, В. Ф. Марценюк, Л. Е. Шатилова и др. // Проблеми кріобіології і кріомедицини. – 2015. – Т.25, №3. – С. 267–286.
9. Высеканцев И. П. Криоконсервирование промышленных и коллекционных штаммов микроорганизмов / И. П. Высеканцев, В. Ф. Марценюк, А. Е. Ананьина, О. М. Бабинец и др. : Глава в кн. «Актуальные проблемы кріобіології и кріомедицины» / под. ред. А. Н. Гольцева. – Харьков, 2012. – С. 401–440.
10. Пат. 72110 UA, МПК G01N 33/48, C12N 11/00 Спосіб визначення життєздатності мікробних клітин, імобілізованих на носіях. / Марценюк В. П.,

Бабінець О. М., Висеканцев І. П.; Заявник і патентовласник Інститут проблем кріобіології і кріомедицини Національної академії наук України. – № u201200178; заявл. 05.01.2012; опубл. 10.08.2012, Бюл. № 15/2012.

11. Пат. 76142 UA, МПК А61К 36/66, А61Р 1/00 Спосіб корекції дисбіозу кишечнику. / Бабінець О. М., Висеканцев І. П., Марценюк В. П.; Заявник і патентовласник Інститут проблем кріобіології і кріомедицини Національної академії наук України. – № u201206832; заявл. 05.06.2012; опубл. 25.12.2012, Бюл. № 24/2012.

12. Бабинец О. М. Сохранность адгезивных свойств пробиотиков *Saccharomyces boulardii* и *Lactobacillus acidophilus* после криоконсервирования / О. М. Бабинец, Н. С. Бычкова : тези Міжнар. наук. конф. студентів та молодих вчених «Актуальні питання сучасної медицини» – Харків, 2009. – С. 8–9.

13. Бабинец О. М. Вивчення впливу захисних середовищ та режиму охолодження на життєздатність біфідобактерій в процесі ліофілізації / О. М. Бабінець, Л. А. Кирилюк : тези Міжнар. наук. конф. студентів та молодих вчених «Актуальні питання сучасної медицини» – Харків, 2009. – С. 9–10.

14. Бабинец О. М. Адсорбция метиленового синего и клеток *Saccharomyces boulardii* энтеросорбентами на различной основе / О. М. Бабинец, В. Ф. Марценюк, Л. Е. Шатилова, И. П. Высеканцев // Проблемы кріобіології і кріомедицини. – 2009. – Т. 19, №2. – С. 232.

15. Высеканцев И. П. Экспериментальное изучение адгезивной и колонизирующей активности иммобилизованных пробиотиков *Saccharomyces boulardii* и *Lactobacillus plantarum* / И. П. Высеканцев, О. М. Бабинец, В. Ф. Марценюк // «Нове у діагностиці, лікуванні і профілактиці імуно- та алергопатологій». - Імунологія та алергологія 2–3, 2009. – С. 161–162.

16. Vysekantsev I. P. Cryopreservation effect on viability of *Saccharomyces boulardii* yeasts adsorbed on enterosorbents [Текст] / I. P. Vysekantsev, O. M. Babinets, V. F. Martsenyuk, L. E. Shatilova : материалы 6-й Объединенной науч. сессии и 2-го Междунар. конгресса по пробиотикам «Санкт-Петербург-Пробиотики-2009», г. Санкт-Петербург, РФ. – Гастроэнтерология Санкт-Петербурга. – №4, 2009. – С. А31.

17. Бабинец О. М. Сохранность лиофилизированных и криоконсервированных пробиотиков, иммобилизованных на энтеросорбентах / О. М. Бабинец, В. Ф. Марценюк, Н. С. Бычкова : матеріали IV Міжнар. конф. молодих науковців «Біологія: від молекули до біосфери». – Харків, 2009. – С. 165.

18. Бабинец О. М. Биологические свойства нативных и криоконсервированных пробиотиков, иммобилизованных на энтеросорбентах / О. М. Бабинец, И. П. Высеканцев, В. Ф. Марценюк : Укр. наук.-практ. конф. з міжнар. участю «Сучасні теорія та практика клінічної імунології та алергології» – Київ, 2010. – Імунологія та алергологія Наука і практика 1(1)2010. – С. 126.

19. Бабинец О. М. Влияние иммобилизованных пробиотиков на видовой и количественный состав микрофлоры пристеночного муцина у животных с экспериментальным дисбиозом / О. М. Бабинец, Н. С. Бычкова : тези Міжнар. наук. конф. студентів та молодих вчених «Актуальні питання сучасної медицини» - Харків, 2010. – С.18–19.

20. Бабінец О. М. Вопросы криоконсервирования пробиотика *Saccharomyces boulardii* / О. М. Бабінец, Т. М. Гурина, А. Л. Кирилук // Проблеми кріобіології і кріомедицини. – 2010. – Т.20, №2. – С. 215.

21. Бабінец О. М. Експериментальні дослідження транслокації кишкової мікрофлори. Вплив іммобілізованих на ентеросорбентах пробіотиків на транслокацію кишкової мікрофлори у тварин з імунодефіцитом, викликаним імуносупресорами / О. М. Бабінець, Л. А. Кирилук : тези між нар. студент. наук. конф. «Актуальні питання сучасної медицини», Харків, 2011. – С. 27–28.

22. Бабінец О. М. Терапевтическое действие иммобилизованных пробиотиков *Saccharomyces boulardii* и *Bifidobacterium bifidum* при экспериментальном химиотерапевтическом дисбиозе, сопровождающемся транслокацией кишечной микрофлоры / О. М. Бабінец, И. П. Высеканцев, В. Ф. Марценюк : XII Укр. наук.-практ. конф. з між нар. участю «Сучасні теорія та практика клінічної імунології та алергології – Київ, 2011. – Імунологія та алергологія Наука і практика 1(1)2011. – С. 61.

23. Бабінец О. М. Сравнительное изучение терапевтического действия нативных и криоконсервированных пробиотиков, иммобилизованных на энтеросорбентах, при экспериментальном дисбиозе / О. М. Бабінец // Проблеми кріобіології і кріомедицини. – 2011. – Т. 21, №2. – С.221.

24. Бабінец О. М. Применение иммобилизованных пробиотиков при экспериментальном дисбиозе и сепсисе у лабораторных животных / О. М. Бабінец : IV південно-укр. наук.-практ. конф. «Фундаментальні проблеми внутрішньої медицини – від молекули до практичного одужання». – Одеса, 2011. – С. 26.

25. Бабінец О. М. Экспериментальное обоснование метода оценки сохранности клеток микроорганизмов-пробиотиков, иммобилизованных на энтеросорбентах / О. М. Бабінец, В. Ф. Марценюк : матеріали VI Міжнар. конф. молодих науковців «Біологія: від молекули до біосфери». – Харків, 2011. – С. 278–280.

26. Бабінец О. М. Сравнительное изучение биологических свойств свободных и иммобилизованных пробиотиков *Bifidobacterium bifidum* и *Lactobacillus bulgaricus* / О. М. Бабінец, И. П. Высеканцев, В. Ф. Марценюк : тези доповідей XIII Укр. наук.-практ. конф. з актуальних питань клінічної та лабораторної імунології, алергології і імунореабілітації // Імунологія та алергологія: наука і практика. Додаток №1, 2012. м. Київ, 2012. – С. 78.

27. Бабінец О. М. Технология получения криоконсервированных препаратов пробиотиков, иммобилизованных на энтеросорбентах / О. М. Бабінец, И. П. Высеканцев, В. Ф. Марценюк // Проблеми кріобіології і кріомедицини. –2012. – Т.22, №2. – С. 209.

28. Бабінец О. М. Экспериментальное обоснование технологии получения препаратов пробиотиков, иммобилизованных на энтеросорбентах / О. М. Бабінец, И. П. Высеканцев, В. Ф. Марценюк : тези Міжнар. наук.-практ. конф. «Сучасні проблеми світової медицини та її роль у забезпеченні здоров'я світового товариства». – м. Одеса, 2012. – С. 20–24.

29. Высеканцев И. П. Биологические свойства криоконсервированных препаратов пробиотиков, иммобилизованных на энтеросорбентах / И. П.

Высеканцев, О. М. Бабинец, В. Ф. Марценюк // Проблемы криобиологии і криомедицини. – 2012. – Т.22, №3. – С. 278.

30. Бабинец О. М. Биологические свойства свободных и иммобилизованных пробиотиков *Bifidobacterium bifidum* и *Lactobacillus bulgaricus* после криоконсервирования и лиофилизации / О. М. Бабинец, В. Ф. Марценюк : тези Міжнар. студент. наук. конф. «Актуальні питання сучасної медицини». – Харків, 2012. – С.23–24.

31. Бабинец О. М. Адсорбция стандартных маркеров и микробных клеток на энтеросорбентах различной химической природы / О. М. Бабинец, Ю. Н. Швец : тези Міжнар. студент. наук. конф. «Актуальні питання сучасної медицини». – Харків, 2013. – С.132.

32. Бабинец О. М. Транслокація кишкової мікрофлори при терапії хіміотерапевтичного дисбіозу в імуносупресованих мишей пробіотиками, іммобілізованими на ентеросорбентах / О. М. Бабинец, Л. А. Кирилюк : тези Міжнар. студент. наук. конф. «Актуальні питання сучасної медицини». – Харків, 2013. – С. 133.

33. Высеканцев И. П. Терапия экспериментального дисбиоза препаратами иммобилизованных антибиотиков и пробиотиков / И. П. Высеканцев, О. М. Бабинец, В. Ф. Марценюк : матеріали наук.-практ. конф. з між нар. участю, присвяченої 90-річчю кафедри інфекційних хвороб Харківського національного університету. – Харків, 2013. – С. 40–41.

34. Бабинец О. М. Ферментативные свойства иммобилизованных на энтеросорбентах пробиотиков после низкотемпературного хранения / О. М. Бабинец // Проблемы криобиологии і криомедицини. – 2013. – Т.23, №2. – С.176.

35. Бабинец О. М. Сохранность антагонистической активности свободных и иммобилизованных на энтеросорбентах пробиотиков после низкотемпературного хранения / О. М. Бабинец, И. П. Высеканцев, В. Ф. Марценюк // Проблемы криобиологии і криомедицини. – 2014. – Т.24, №2. – С.172.

36. Высеканцев И. П. Влияние криоконсервированных иммобилизованных препаратов пробиотиков на синтез цитокинов при экспериментальном дисбиозе кишечника у мышей / И. П. Высеканцев, О. М. Бабинец : материалы Междунар. заоч. науч.-практ. конф. «Теоретические и практические аспекты современной криобиологии». – Сыктывкар, 2014. – С. 121–124.

37. Бабинец О. М. Терапевтическая эффективность иммобилизованного препарата антибиотика и пробиотика после низкотемпературного хранения / О. М. Бабинец, И. П. Высеканцев, В. Ф. Марценюк // Проблемы криобиологии і криомедицини. – 2015. – Т.25, №2. – С.176.

38. Babinets O. M. Low-Temperature Storage of Enterosorbent-Immobilized Probiotics / O. M. Babinets, I. P. Vysekantsev, V. F. Martsenyuk : 52nd Annual Meeting of the Society for Cryobiology CRYO2015. – Ostrava, Czech Republic. – P. 51–52.

39. Babinets O. M. Biological properties of probiotic microorganisms after immobilization on carbon-containing sorbents and low temperature storage / O. M. Babinets, I. P. Vysekantsev, V. F. Martsenyuk : International Conference and Exhibition on Tissue Preservation and Bio-banking, July 20–22 2015, Barcelona, Spain. J. Tissue Sci. Eng. 2015 – Vol. 6 – Issue 2 – P. 87.

## АНОТАЦІЯ

**Бабінець О. М. Біологічні властивості іммобілізованих на ентеросорбентах пробіотиків після низькотемпературного зберігання**

*Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата медичних наук за спеціальністю 14.01.35 – кріомедицина. – Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, Харків, 2016.*

Дисертаційна робота присвячена вивченню біологічних властивостей пробіотиків після іммобілізації на ентеросорбентах і наступного зберігання при низьких температурах. Експериментально визначено умови іммобілізації пробіотиків *S. boulardii*, *B. bifidum*, *L. bulgaricus* на сорбентах на основі активованого вугілля «Сорбекс», «СУМС-1». Розроблено спосіб визначення збереженості комплексів «носій-клітини» (Патент України 72110). Показано, що на збереженість комплексів «носій-клітини» впливають швидкість охолодження, видова кріорезистентність мікроорганізмів, склад середовища консервування, а також будова носія. Зберігання при температурах  $-80$ ,  $-196^{\circ}\text{C}$  протягом року забезпечує збереженість репродуктивних доз іммобілізованих пробіотиків. Іммобілізація пробіотиків на ентеросорбентах і наступне зберігання при  $-80$ ,  $-196^{\circ}\text{C}$  не впливають на спектри антагоністичної та цукролітичної активності, резистентності до антибіотиків, шлункового соку. В іммобілізованих пробіотиків більш висока резистентність до солей жовчі. Іммобілізовані на ентеросорбентах пробіотики до та після низькотемпературного зберігання забезпечують більш швидке й повне відновлення індигенної мікрофлори кишечника і ерадикацію транслокованої кишкової мікрофлори у лабораторних тварин із експериментальним дисбіозом. Отримані результати можуть бути використані під час розробки технологій виробництва комерційних препаратів пробіотиків IV покоління і методів їх довгострокового зберігання.

**Ключові слова:** пробіотики, ентеросорбенти, іммобілізація, мікробіоценоз, низькотемпературне зберігання, експериментальний дисбіоз кишечника.

## АННОТАЦИЯ

**Бабінець О. М. Биологические свойства иммобилизованных на энтеросорбентах пробиотиков после низкотемпературного хранения**

*Диссертация на соискание научной степени кандидата медицинских наук по специальности 14.01.35 – криомедицина. – Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, Харьков, 2016.*

Диссертационная работа посвящена изучению биологических свойств пробиотиков после иммобилизации на энтеросорбентах и последующего хранения при низких температурах.

Показано, что эффективность иммобилизации микробных клеток на энтеросорбентах зависит от химического состава сорбента, температуры и длительности сорбции, соотношения количества микробных клеток к массе сорбента. Экспериментально обоснованы условия иммобилизации пробиотиков *S. boulardii*, *B. bifidum*, *L. bulgaricus* на энтеросорбентах на основе активированного

угля «Сорбекс», «СУМС-1»: покачивание на качалке ( $\approx 75$  оборотов платформы в минуту) при температуре  $0-2^{\circ}\text{C}$  в течение 30–60 минут и соотношение  $10^7$  клеток/г сорбента.

С помощью РЭМ и ЛМ установлено, что во время иммобилизации часть микробных клеток адгезирует непосредственно к поверхности носителя, другая – проникает на различную глубину в макропоры материала носителя. Замораживание до  $-196^{\circ}\text{C}$  не изменяет морфологию клеток. В полученных образцах одновременно с комплексами «носитель-клетки» находятся свободные клетки.

Разработан запатентованный способ определения сохранности отделенных от свободных клеток комплексов «носитель-клетки», при котором учитывают макроколонии, сформированные жизнеспособными клетками, иммобилизованными на поверхности одной частицы носителя (Патент України 72110).

Показано, что во время замораживания до низких температур на сохранность комплексов «носитель-клетки», как и на жизнеспособность свободных клеток, влияют видовая криорезистентность микроорганизмов, состав среды криоконсервирования, скорость охлаждения, а также строение носителя. Анализ полученных результатов показал, что механизмы криоповреждений иммобилизованных клеток микроорганизмов отвечают положениям классической двухфакторной теории криоповреждений биологических объектов. Высказано предположение, что установленный факт более выраженного повреждающего действия низких температур на иммобилизованные клетки связан с тем, что часть клеточной поверхности тесно контактирует со структурами сорбентов. В результате этого поверхность клеток, которая принимает участие в транспорте воды, уменьшается при сохраненном объеме клеток. Это вызывает усиление процессов внутриклеточной кристаллизации при заданной скорости охлаждения. Обоснованы наиболее эффективные режимы криоконсервирования иммобилизованных пробиотиков: для *S. boulardii* – охлаждение на первом этапе со скоростью 1град/мин в 5% растворах сахарозы, ДМСО, в пивном сусле (8°Б), для *B. bifidum* – охлаждение на первом этапе со скоростью 1град/мин в 5% растворе сахарозы, среде МРС-Ц, физиологическом растворе, для *L. bulgaricus* – охлаждение на первом этапе со скоростями 1-10град/мин в 5% растворе сахарозы, обезжиренном молоке с добавлением 5% сахарозы, физиологическом растворе.

Хранение при температурах  $-80$ ,  $-196^{\circ}\text{C}$  в течение года (срок наблюдения) обеспечивает сохранность репродуктивных доз иммобилизованных пробиотиков. В образцах *S. boulardii*, иммобилизованных на «Сорбекс», количество КОЕ/мл понизилось с  $7,9 \lg$  при  $-80^{\circ}\text{C}$  на  $1,68 \lg$ , при  $-196^{\circ}\text{C}$  – на  $0,5 \lg$ . Количество комплексов «*S. boulardii*-СУМС-1» при  $-80^{\circ}\text{C}$  понизилось с  $7,3 \lg$  на  $1,4 \lg$ , при  $-196^{\circ}\text{C}$  – на  $1,1 \lg$ . В образцах *B. bifidum*, иммобилизованных на «Сорбекс» и «СУМС-1», количество КОЕ/мл при  $-80^{\circ}\text{C}$  снизилось, соответственно, с  $8,3 \lg$  на  $0,1 \lg$  и с  $7,9 \lg$  на  $0,2 \lg$ . При  $-196^{\circ}\text{C}$  иммобилизованные *B. bifidum* не погибали. Комплексы «*L. bulgaricus* -«Сорбекс» при температурах  $-80...-196^{\circ}\text{C}$  не погибали. Количество комплексов «*L. bulgaricus*-«СУМС-1» снизилось при  $-80^{\circ}\text{C}$  и  $-196^{\circ}\text{C}$ , соответственно, с  $8,15 \lg$  на  $1,0 \lg$  и  $0,5 \lg$ . В случае снижения количества комплексов в образцах, которые хранили при  $-196^{\circ}\text{C}$ , их гибель происходила только на этапах замораживания-оттаивания. В отличие от приведенных режимов хранения

при температурах 4°C, -20°C было неэффективным: иммобилизованные пробиотики погибали в течение всего срока хранения.

Показано, что иммобилизация пробиотиков на энтеросорбентах и последующее хранение при температурах -80, -196°C не влияют на спектры антагонистической активности по отношению к условно-патогенным и патогенным микроорганизмам, антибиотикорезистентности, сахаролитической активности, на резистентность к желудочному соку. У комплексов иммобилизованных пробиотиков более высокая резистентность к солям желчи.

Иммобилизованные на энтеросорбентах пробиотики до и после низкотемпературного хранения обеспечивают более быстрое и полное восстановление индигенной микрофлоры кишечника лабораторных животных с экспериментальным химиотерапевтическим дисбиозом. У иммуносупрессированных животных с экспериментальным дисбиозом иммобилизованные пробиотики способствовали более быстрой эрадикации из внутренних органов транслоцированной кишечной микрофлоры. Терапевтический эффект от применения свободных клеток пробиотиков и смесей свободных клеток с энтеросорбентами был менее выражен. Разработанный способ коррекции дисбиоза кишечника иммобилизованными пробиотиками защищен патентом Украины 76142.

Таким образом, проведенные исследования свидетельствуют о сохранности биологических свойств пробиотиков после иммобилизации на энтеросорбентах и последующего низкотемпературного хранения, а также об их более высокой терапевтической эффективности при терапии экспериментального дисбиоза кишечника у животных. Полученные результаты могут быть использованы при разработке технологий производства коммерческих препаратов пробиотиков IV поколения и методов их долгосрочного хранения.

**Ключевые слова:** пробиотики, энтеросорбенты, иммобилизация, микробиоценоз, низкотемпературное хранение, экспериментальный дисбиоз кишечника.

## ANNOTATION

### **Babinets O. M. Biological properties of enterosorbents-immobilized probiotics after low temperature storage**

*Dissertation for the candidate of medical science degree (PhD equivalent) in specialty 14.01.35 – cryomedicine. – Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkiv, 2016.*

The thesis is devoted to studying the biological properties of probiotics after immobilization on enterosorbents and following storage at low temperatures. Experimentally determined conditions of immobilization of probiotic *S. boulardii*, *B. bifidum*, *L. bulgaricus* on sorbents based on activated carbon "Sorbeks", "SUMS-1". The method of determining preservation systems "carrier cells" (Ukraine Patent 72110) was developed. It has been shown that during freezing the preservation rate of the "carrier-cells" systems, as well as the viability of free cells are influenced by the carrier structure, cooling rate, species cryoresistance of microorganisms, composition of preservation medium. Storage at -80, -196°C for 1 year provided the safety of reproductive doses of immobilized probiotics. Immobilization of probiotics on enterosorbents and subsequent



storage at temperatures of  $-80$ ,  $-196^{\circ}\text{C}$  have been shown as not affecting the spectra of antagonistic and saccharolytic activities, resistance to antibiotics, gastric juice. The resistance to bile salts was higher in immobilized probiotics. The immobilized on enterosorbents probiotics prior to and after low temperature storage provided more rapid and complete recovery of indigenous gastro-intestinal microflora of the laboratory animals with experimental dysbiosis, promoted faster eradication of translocated intestinal microflora from internal organs. The obtained results can be used when developing the technologies for the production of commercial probiotics IV generation drugs and methods of their long-term storage.

**Keywords:** probiotics, enterosorbents, immobilization, microbiocenosis, low temperature storage, experimental intestinal dysbiosis.

Відповідальний за випуск – д.б.н. Г. О. Бабійчук