

А.Н. Шульга, Е.В. Карпенко, А.А. Туровский, Т.В. Коронелли // Микробиология. — 1990. — Т. 59, вып. 3. — С. 443-447.

10. Шкідливі речовини. Класифікація та загальні умови безпеки: ГОСТ 12.1.007-76.

11. Гігієнічні вимоги поводження з промисловими відходами та визначення їхнього класу небезпеки для здоров'я населення: ДСанПіН 22.7.029-99.

12. Санітарно-гігієнічна оцінка комплексу документів щодо використання в Україні біопрепарату PS-17: звіт до протоколу № 1 від 2004 р. / А.К. Маненко, Н.А. Хоп'як (Висновок державної санітарно-гігієнічної експертизи № 05.03.02-04/42465 від 25.10.2004 р.; Протокол експертизи Львівської облСЕС № 38/01 від 25.10.2004 р).

13. Квантово-хімічна модель поверхнево-активного комплексу штаму PS-17 / В.І. Похмурський, Р.Є. Пристанський, О.В. Карпенко, О.М. Шульга // Доп. НАН України. Сер. Б, геол., хім. біол. — 1997. — № 9. — С. 151-154.

14. Поверхностно-активные соединения культуры *Pseudomonas sp. S.-27* / Е.В. Карпенко, А.Н. Шульга, С.А. Щеглова и др. // Микробиологический журнал. — 1996. — Т. 58, № 5. — С. 18-24.

15. Речовина поверхнево-активна "Поликом": ТУ 2.4.5.-326134. 46-004:2004 / Й.П. Шевчук, А.К. Маненко, О.В. Карпенко. — Львів, 2004. — 12 с. (Висновок державної санітарно-гігієнічної експертизи № 05.03.02-04/42465 від 25.10.2004 р.; Протокол експертизи Львівської облСЕС № 38/01 від 25.10.2004 р).

16. Токсикологический паспорт биореагента культуры *Pseudomonas species PS-17* / Н.В. Гринь, Н.Н. Говорунова. — Донецьк, 1991. — 7 с.

17. Syldatk C. Chemical and physical characterization of four interfacial-active zhamnolipids from *Pseudomonas sp. PSM 2874* grown on n-alkanes / C. Syldatk, S. Lang, F. Wagner // Z. Naturforsch. — 1984. — V. 40. — P. S1060.

18. Гігієнічна оцінка адсорбційних властивостей глауконітоліту стосовно іонів ртуті (II) / Н.А. Хоп'як, С.Т. Омельчук, А.К. Маненко, С.І. Матисік та ін. // Проблеми екології та медицини. — 2010. — Т. 14, № 1, 2. — С. 31-34.

Надійшла до редакції 17.12.2010.

AN EXPERIMENTAL ASSESSMENT OF IMMUNOSTIMULATING ACTIVITY OF BIFIDUMBACTERIUM REFERENCE STRAINS

Krivoshlik M.A., Nastoyascha N.I., Sakhnyuk O.N., Surmasheva E.V., Kirsanova A.S., Putiyenko R.V., Nikonova N.A.

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНЕ ВИВЧЕННЯ ІМУНОСТИМУЛЮЮЧОЇ ДІЇ ЕТАЛОННОГО ШТАМУ БІФІДОБАКТЕРІЙ



**КРИВОШЛИК М.О.,
НАСТОЯЩА Н.І.,
САХНЮК О.М.,
СУРМАШЕВА О.В.,
КІРСАНОВА О.С.,
ПУТІЄНКО Р.В.,
НІКОНОВА Н.О.**

ДП "Державний експертний центр МОЗ України", м. Київ;

ДУ "Інститут гігієни і медичної екології ім. О.М. Марзеева АМН України", м. Київ

УДК 615.337 : 57.0831

станніми роками серед людей усіх вікових груп все частіше виникають порушення складу нормальної мікрофлори шлунково-кишкового тракту (ШКТ), які проявляються синдромом дисбактеріозу. Вагому роль у масовому поширенні дисбактеріозів разом з серйозними захворюваннями організму та використанням сильнодіючих антибіотиків почали відігравати екологічні фактори з комплексом зовнішніх впливів: забруднення навколишнього середовища, хімізація побуту, відсутність повноцінного харчування, стресові ситуації тощо.

Нормальна мікрофлора ШКТ людини являє собою екосистему, яка бере участь у формуванні імунних процесів організму і складається з численної кількості бактерій, без яких неможлива нормальна життєдіяльність макроорганізму. Окремі біоценози органів та систем макроорганізму перебувають у тісній кооперації та взаємодіють між собою і з

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ ИММУНОСТИМУЛИРУЮЩЕГО ДЕЙСТВИЯ ЭТАЛОННОГО ШТАММА БИФИДОБАКТЕРИЙ

Кривошлык М.А., Настоящая Н.И., Сахнюк О.Н., Сурмасева Е.В., Кирсанова А.С., Путиенко Р.В., Никонова Н.А.

Проведено експериментальне дослідження імуностимулюючих властивостей пробіотических штаммов бифідобактерій — лабораторного еталонного образця, ізолята из препарата и пробіотического препарата "Бифідумбактерин сухой". Исследования направлены на изучение влияния пробіотических штаммов на иммунную систему организма животных в зависимости от продолжительности и схемы приема препаратов. Способность пробіотических штаммов бифідобактерій непосредственно влиять на клетки иммунной защиты определяли в опытах *in vivo* по изменению функциональной активности макрофагов перитонеального экссудата.

Определено, что лабораторный эталонный штамм в сравнительных экспериментах с препаратом "Бифідумбактерин сухой" и изолированным из него штаммом практически в равной мере влияют на иммунную систему организма. Также показано, что в зависимости от продолжительности приема изучаемых образцов стимуляция макрофагов активнее происходила под влиянием лабораторного эталонного штамма.

© Кривошлык М.О., Настоящая Н.І., Сахнюк О.М., Сурмасева О.В., Кірсанова О.С., Путієнко Р.В., Ніконова Н.О. СТАТТЯ, 2011.

організмом хазяїна, утворюючи єдину мікроекологічну систему, яка є важливою багатофункціональною частиною організму людини [1-3].

Найважливішими функціями даної екосистеми є участь в обмінних процесах організму людини, здатність протидіяти патогенним та умовно-патогенним бактеріям, покращання процесів перетравлювання їжі, стимуляція неспецифічного імунітету.

У процесі еволюції всі відкриті порожнини та шкірні покрови людини заселили мікробні популяції. Формування якісного та кількісного складу регулюється складним механізмом мікробних взаємодій та контролюється фізіологічними факторами макроорганізму у процесі його життя [1].

Серед різноманіття бактерій, які утворюють нормальну мікрофлору, особливе місце посідають біфідобактерії — найбільш численні представники облигатної мікрофлори кишечника дітей та дорослих. Біфідобактерії присутні у кишечнику протягом усього періоду життя людини і становлять від 90% до 98% усіх мікроорганізмів кишечника залежно від віку людини. Так, кількість біфідобактерій у кишечнику немовлят становить 10^{10} - 10^{12} КУО/г фекалій, дітей старшого віку та дорослих — 10^9 - 10^{10} КУО/г фекалій, людей літнього віку — 10^8 - 10^9 КУО/г фекалій [4, 6].

Біфідобактерії впливають на здатність організму протистояти інфекціям не тільки за рахунок участі у метаболічних процесах. Доведено їхню суттєву роль у реалізації таких механізмів неспецифічної резистентності організму, як індукція утворення секреторних імуноглобулінів (у поєднанні з уповільненням їх деградації), інтерферону і лізоциму, посилення проліферативної реакції клітин пейєрових бляшок у стінці кишечника [3, 5, 7].

Біфідобактерії також володіють імуностимулюючою активністю. У нормі ці мікроорганізми сприяють стимуляції імунореактивності організму за рахунок постійного антигенного подразнення системи локального імунітету. Крім того, стимуляція місцевого гуморального та клітинного імунітету, викликана біфідобактеріями,

сприяє підтримці колонізаційної резистентності загальної нормофлори людини [7].

Мета дослідження — експериментальне вивчення імуностимулюючих властивостей пробіотичних штамів біфідобактерій — лабораторного еталонного зразка, ізоляту із препарату та пробіотичного препарату "Біфідумбактерин сухий" — шляхом дослідження імунологічної реактивності дослідних тварин, що отримують ці препарати. Дослідження спрямовані на вивчення впливу пробіотичних штамів на імунну систему організму залежно від тривалості та схеми приймання препаратів.

Об'єкти дослідження:

□ пробіотичний препарат "Біфідумбактерин сухий" виробництва ФДУП "НВО "Мікроген", Росія;

□ ізолят штаму *B. bifidum* № 1 з препарату "Біфідумбактерин сухий";

□ лабораторний еталонний зразок *B. bifidum* ББ/1.

Матеріали і методи дослідження. Виділення штаму *B. bifidum* № 1 з препарату "Біфідумбактерин сухий" та отримання лабораторного зразка проводили у відповідності з патентом на корисну модель "Спосіб визначення штамів біфідобактерій для створення еталонних зразків пробіотичних препаратів" [8]. Для культивування біфідобактерій використовували поживні середовища: тверде середовище MRS; напіврідке Біфідумсередовище виробництва ДНЦПМ (Росія).

Здатність пробіотичних штамів біфідобактерій безпосередньо впливати на клітини імунного захисту визначали у дослідях *in vivo* за зміною функціональної активності макрофагів перитонеального ексудату.

Експеримент проводили на безпородних білих мишах (самцях) віком 3 тижні, масою 16-20 г, отриманих з віварію ДП "Центр імунобіологічних препаратів". Піддослідні тварини протягом 15 днів утримувалися на карантині і не мали жодних ознак захворювання. Акліматизація до зміни умов утримування відбувалася відповідно до правил, прийнятих FELASA — "The Federation of European Laboratory Animal Science Associations", що встановлює біоетичні норми та правила поводження з лабораторними тваринами в Європі та за її межами. Миші перебували у віварії за температури 18-20°C, атмосферного тиску 84,0-106,7 кПа (630-800 мм рт. ст.); відносної вологості повітря 50-65%; максимально допустимої концентрації у повітрі аміаку 0,01 міліграм/л, вуглекислого газу — 0,15%. Концентрація агресивних речовин у повітрі не перевищувала ГДК для повітря робочої зони. Для годування використовували сертифікований "комбікорм крупногранульований, збалансований" (добова доза 11,0 г) та воду.

Мишей виводили із дослідів з дотриманням "Правил проведення робіт з використанням експериментальних тварин" — декапітацією під легким ефірним наркозом.

Таблиця 1

Групи тварин, сформовані для вивчення впливу пробіотичних штамів у дослідях *in vivo*

Група	Кількість особин	Тривалість дослідів, днів	Характеристика групи
I (контрольна)	10 10 10	7 14 21	Усі тварини отримували 0,9% розчин натрію хлориду по 0,5 мл перорально
II	10 10 10	7 14 21	Усі тварини отримували бактеріальну суспензію, приготовану на основі еталонних зразків штаму <i>B. bifidum</i> ББ/1, по 0,5 мл перорально
III	10 10 10	7 14 21	Усі тварини отримували бактеріальну суспензію, приготовану на основі препарату "Біфідумбактерин сухий", по 0,5 мл перорально
IV	10 10 10	7 14 21	Усі тварини отримували суспензію, приготовану на основі ізолятів колоній <i>B. bifidum</i> № 1, по 0,5 мл перорально

AN EXPERIMENTAL ASSESSMENT OF IMMUNOSTIMULATING ACTIVITY OF BIFIDUMBACTERIUM REFERENCE STRAINS

Krivoshlik M.A., Nastoyascha N.I., Sakhnyuk O.N., Surmasheva E.V., Kirsanova A.S., Putiyenko R.V., Nikonova N.A.

Experimental assessment of immune stimulating properties of bifidumbacterium probiotic strains — the laboratory reference sample, isolated from preparation strain and a probiotic preparation "Bifidumbacterinum siccum" is spent. The researches are referred on study of probiotic strains influence for immune system of an animal organism in dependence of duration and the

scheme of preparations reception. An ability of bifidumbacterium probiotic strains to immediately influence for immune protection cells was defined in vivo experiences of functional activity change of peritoneal exudate macrophages.

It was defined that laboratory standard strain in comparative experiments with preparation "Bifidumbacterinum siccum" and isolated from it strain have an equal influence for immune system of organism. It was also shown that under impact of laboratory standard strain the stimulation of macrophages was going actively in dependence of length of reception of tested samples.

В експерименті було досліджено 120 мишей, розподілених на 4 групи по 30 особин (табл. 1).

На 7, 14 та 21 добу перорального введення суспензій тваринам з кожної групи відбирали по 5 мишей та вводили внутрішньочеревно по 0,5 мл приготованої суспензії дріжджів. Суспензію дріжджів готували так: 1,0 г свіжих дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* в асептичних умовах поміщали у мірну колбу ємністю 250 мл, суспендували у 100 мл стерильної води та методом серійних розведень отримували суспензію дріжджів з кількістю $5,0 \times 10^7$ клітин/мл. Кількість клітин дріжджів перевіряли у камері Горяєва. Приготовану суспензію інактивували кип'ятінням на водяній бані протягом 30 хв. За 45 хвилин після внутрішньочеревного введення суспензії дріжджів тварин з кожної групи виводили з досліду цервікальною дислокацією під легким ефірним наркозом. До черевної порожнини тварин вводили 2 мл 0,9% ізотонічного розчину натрію хлориду та масажували черевце пальцями протягом 20 с. Робили надріз черевної порожнини, відбирали 0,02 мл

перитонеального ексудату. На предметних скельцях робили мазки, висушували їх на повітрі та фарбували за модифікованим методом Папенгейма-Крюкова.

Облік отриманих результатів здійснювали під мікроскопом та визначали відсоток фагоцитозу (ВФ) — відсоток фагоцитуючих клітин, які містили клітини дріжджів, та фагоцитарне число (ФЧ), яке розраховували за формулою (1):

$$\text{ФЧ} = \frac{a \times 5 + b \times 10 + c \times 15}{\text{ВФ}}, \text{ у.о. (1)}$$

де а — кількість фагоцитуючих клітин, які поглинули 5-9 клітин дріжджів; b — кількість фагоцитуючих клітин, які містять 10-14 клітин дріжджів; c — кількість фагоцитуючих клітин, в яких кількість клітин дріжджів складає 15 і більше.

Статистичну обробку отриманих даних проведено на ПК Intel® Pentium Dual-Core inside, цифровий матеріал у кожній окремій вибірці перевірено та підтверджено на нормальне розподілення величин. Для численних даних розраховували середнє арифметичне, дисперсію та стандартне ква-

дратичне відхилення. Інтервал надійності отримували з вірогідністю 95% [9].

Результати та їх обговорення. При потраплянні до організму чужорідних антигенів (клітин культури дріжджів *Saccharomyces cerevisiae*) активізується неспецифічний імунітет, що пов'язаний переважно з діяльністю макрофагів. За звичайних умов макрофаги мають невеликі розміри та розміщені поодинокі. На рисунку 1 спостерігається незначна кількість щойно утворених поодиноких

Рисунок 1
Мікроскопіювання зразка перитонеального ексудату мишей групи №1

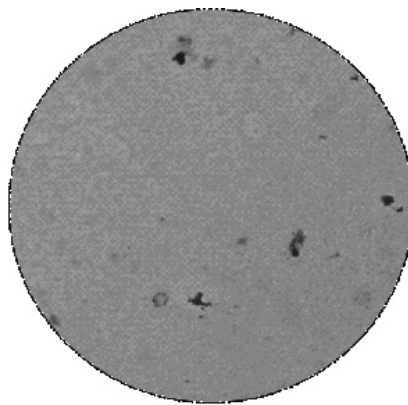


Рисунок 2

Мікроскопіювання зразка перитонеального ексудату мишей групи III:
а — 7 дів спостереження; б — 14 дів спостереження; в — 21 доба спостереження

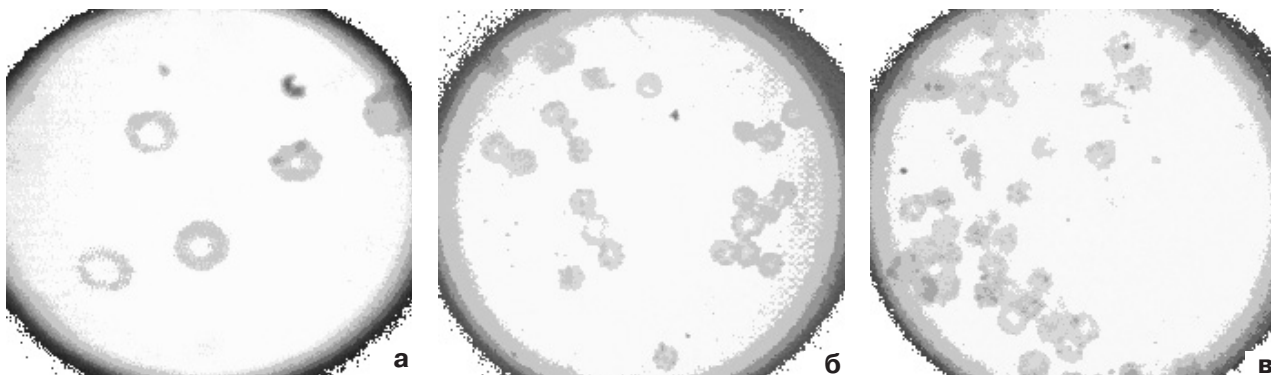
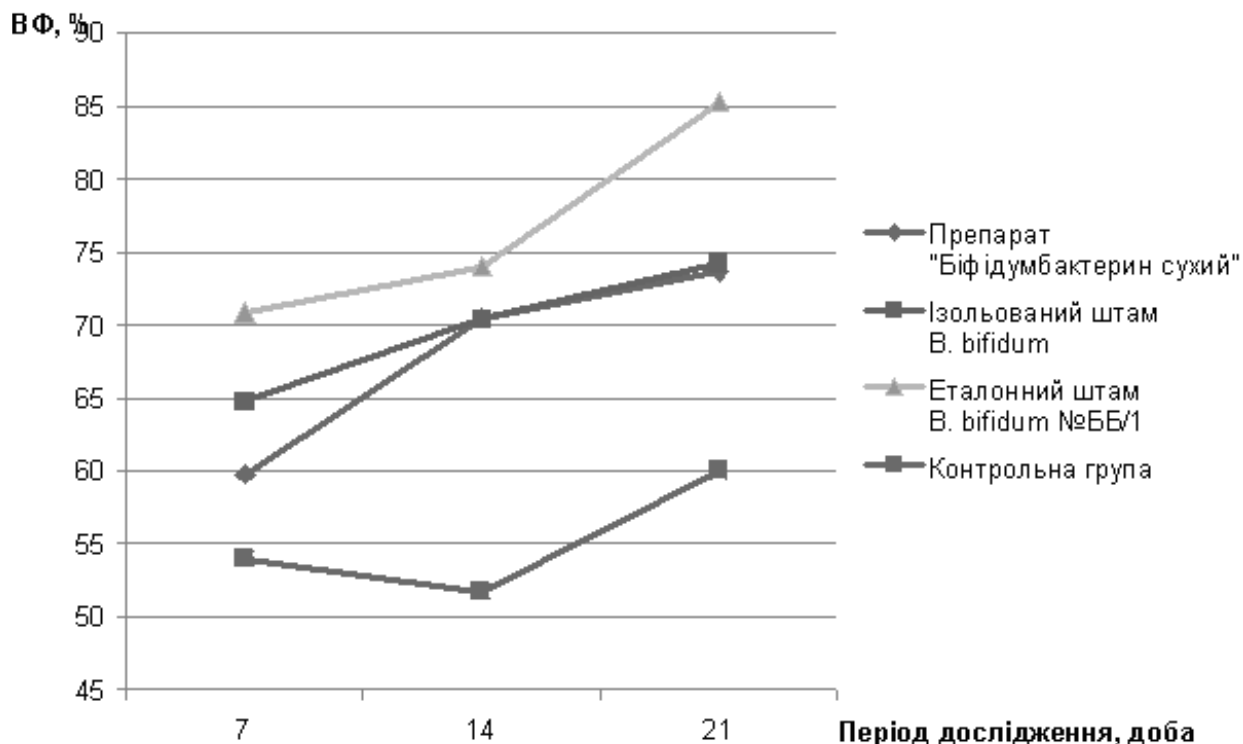


Рисунок 3

Вплив тривалості прийому препарату "Біфідумбактерин сухий" на ВФ макрофагів



макрофагів невеликих розмірів, ледь помітних при мікроскопіюванні, у присутності великої кількості нефагоцитова-

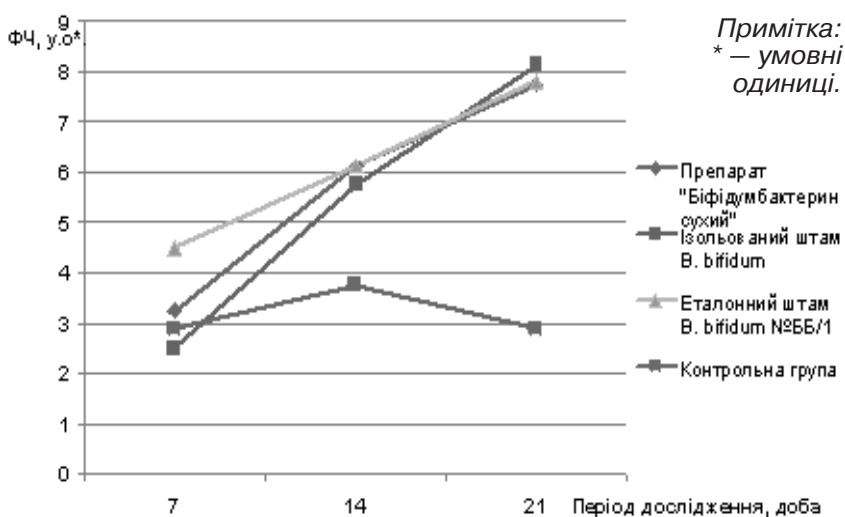
них клітин дріжджів, що пов'язано з недостатньою активністю синтезу фагоцитів.

Мікроскопічний вигляд при-

готованих зразків перитонеального ексудату мишей групи III (тварини, які отримували суспензію, приготовану на основі препарату "Біфідумбактерин сухий" по 0,5 мл перорально) протягом різних термінів зображено на рисунку 2.

Рисунок 4

Вплив тривалості прийому препарату "Біфідумбактерин сухий" на ФЧ макрофагів



Примітка: * — умовні одиниці.

З наведених рисунків видно, що введення експериментальним тваринам препарату "Біфідумбактерин сухий" протягом 7 днів стимулює незначне збільшення розмірів синтезованих макрофагів та їх кількості, а також подальше зростання кількості макрофагів протягом наступних 14 днів.

Значення показників фагоцитарної активності макрофагів в усіх досліджених групах тварин на 7-му добу спостережень наведено у таблиці 2.

З наведених даних табл. 2 видно, що вже на 7-му добу

Таблиця 2

Показники поглинальної активності макрофагів на 7 добу

Група	ВФ, %	ФЧ, у.о.*
I	54,50±0,87	2,88±0,52
II	70,88±1,74	4,5±0,46
III	59,75±1,53	3,25±0,41
IV	64,75±1,62	3,50±0,53

Таблиця 3

Показники поглинальної активності макрофагів на 14 добу

Група	ВФ, %	ФЧ, у.о.*
I	51,75±2,22	3,75±0,77
II	74,00±1,89	6,13±0,95
III	70,50±2,30	6,13±0,95
IV	70,38±2,27	5,75±0,92

Таблиця 4

Показники поглинальної активності макрофагів на 21 добу

Група	ВФ, %	ФЧ, у.о.*
I	60,00±2,04	2,88±0,55
II	85,25±1,52	7,81±0,30
III	73,63±3,22	7,75±0,31
IV	74,25±3,18	8,13±0,40

Примітка до таблиць 2-4: * — умовні одиниці.

введення тваринам досліджуваних зразків спостерігається певна різниця у значеннях показників, що характеризують фагоцитарну активність макрофагів. Зокрема, можна стверджувати, що введення тваринам досліджуваних зразків препарату "Біфідумбактерин сухий" та препаратів порівняння викликає підвищення показників фагоцитозу порівняно з контрольною групою. Так, найбільше зростання показника ФЧ спостерігалось у групі тварин, яка отримувала еталонний зразок штаму *V. bifidum* ББ/1. Незначні відхилення між значеннями ВФ та ФЧ для препарату "Біфідумбактерин сухий" та його ізолятів при порівнянні показників фагоцитарної активності можна пояснити впливом технологічних процесів виготовлення пробіотичних препаратів на зниження функціональної активності культур мікроорганізмів.

Дані показників фагоцитарної активності макрофагів, отримані для всіх досліджуваних груп тварин на 14-ту добу спостереження, наведено у таблиці 3.

Аналіз даних, наведених у таблиці 3, демонструє збереження тенденції до зростання фагоцитарної активності макрофагів, спостерігається подальше збільшення відсотка фагоцитуючих клітин та значення фагоцитарного числа.

Дані показників фагоцитарної активності макрофагів, отримані для всіх досліджених груп тварин на 21-шу добу спостереження, наведено у таблиці 4.

Отримані результати свідчать про подальше зростання показників фагоцитарної активності макрофагів. Так, відсоток фагоцитозу у кожній з досліджених груп збільшується у середньому на 3-5% при пропорційному збільшенні показника фагоцитарного числа.

Узагальнення отриманих експериментальних даних для досліджуваних штамів біфідобактерій дозволяє встановити низку закономірностей:

□ після введення тваринам дослідних зразків пробіотичних штамів показник ВФ для кожної експериментальної групи підвищився у середньо-

му на 10-20% порівняно з контрольною групою;

□ дослідний препарат, приготований на основі лабораторного еталонного зразка *V. bifidum* ББ/1, має найбільшу активність щодо стимуляції фагоцитозу (ВФ становить 85%) (рис. 3);

□ значення збільшення ВФ за дії препарату "Біфідумбактерин сухий" та штаму біфідобактерій, ізольованого з нього, знаходяться практично на одному рівні з незначним відставанням препарату (рис. 3);

□ значним фактором впливу на імунотулюючий ефект пробіотичних штамів біфідобактерій є тривалість їх прийому. Так, після 7 діб прийому спостерігається часткове збільшення кількості макрофагів та підвищення показників їхньої поглинальної активності. Але значне зростання цих показників починається лише після 14-ї доби прийому (рис. 3, 4).

Висновки

1. Отримані експериментальні дані *in vivo* свідчать про позитивний стимулюючий вплив штамів *V. bifidum* на імунну систему, а саме її неспецифічну складову — фагоцитарну систему макрофагів: підсилення їх активного синтезу та поглинальної здатності.

2. Встановлено, що зі збільшенням тривалості введення біфідобактерій у вигляді ізолятів або штамів лабораторного еталонного зразка значно активізується синтез макрофагів, збільшуються їхні розміри та підвищується фагоцитарна активність.

3. Імуностимулююча дія еталонного штаму *V. bifidum* може бути одним з критеріїв гігієнічної оцінки пробіотичних штамів мікроорганізмів.

ЛІТЕРАТУРА

1. Янковский Д.С. Состав и функции микробиоценозов различных биотопов человека / Д.С. Янковский // Здоровье женщины. — 2003. — № 4 (16). — С. 145-158.

2. Пархоменко Л.К. Микробиология кишечника и ее коррекция в детском возрасте / Л.К. Пархоменко, Е.В. Репетева // Сучасна гастроентерологія. — 2006. — № 3 (29). — С. 72-75.

3. Печінка А.М. Застосування "Біфідумбактерину" у формі

ректальних супозиторіїв у комплексному лікуванні хворих на гострі кишкові інфекційні хвороби / А.М. Печінка, І.В. Шестакова, О.А. Гудзенко, К.В. Курищук, В.А. Марченко // Сучасні інфекції. — 2007. — № 2. — С. 28-32.

4. Бондаренко В.М. Дисбактериоз кишечника как клинико-лабораторный синдром: современное состояние проблемы / В.М. Бондаренко, Т.В. Мацулевич. — М.: ГЭОТАР-Медиа, 2007. — 304 с.

5. Грачева Н.М. Пробиотические препараты в терапии и профилактике дисбактериоза кишечника / Н.М. Грачева, В.М. Бондаренко // Инфекционные болезни. — 2004. — № 2. — С. 53-58.

6. Дисбактериоз кишечника (клиника, диагностика, лечение): [руководство для врачей] / Ю. В. Лобзин, В.Г. Макарова, Е.Р. Корвякова, С.М. Захаренко. — СПб.: ООО "Издательство "ФОЛИАНТ", 2006. — 256 с.

7. Коваленко Н.К. Научное обоснование и практическое использование пробиотических препаратов / Н.К. Коваленко // Вісник фармакології та фармації. — 2007. — № 6. — С. 10-15.

8. Пат. 53337. Україна, МПК7 С12 № 11/00. Спосіб визначення штамів біфідобактерій для створення еталонних зразків пробіотичних препаратів / Мойсеева Г.В., Настояща Н.І., Кривошлик М.О., Сахнюк О.М.; заявник і патентовласник ДП "Центр імунобіологічних препаратів". — № u201001092; заявл. 03.02.2010 р.; опубл. 11.10.2010 р., Бюл. № 19.

9. Юнкеров В.И. Математико-статистическая обработка данных медицинских исследований / В.И. Юнкеров, С.Г. Григорьев. — СПб.: ВМедА, 2006. — 266 с.

Надійшла до редакції 10.03.2011.