

ДНІПРОВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ІМЕНІ ОЛЕСЯ ГОНЧАРА
Факультет біолого-екологічний
Кафедра мікробіології, вірусології та біотехнології

Кваліфікаційна робота

другий (магістерський) рівень вищої освіти
за спеціальністю 162 Біотехнології та біоінженерія

на тему: **«ВИКОРИСТАННЯ УЛЬТРАЗВУКОВОГО ТА
ЕНЗИМАТИЧНОГО МЕТОДІВ ДЕЗІНТЕГРАЦІЇ ДЛЯ
ОТРИМАННЯ ІМУНОМОДЕЛЮЮЧИХ
БІОТЕХНОЛОГІЧНИХ ПРЕПАРАТІВ НА ОСНОВІ
ЛАКТОБАЦИЛ»**

Виконавець:

студентка групи БН-22м-1

Самуїлова Карина Андріївна

Керівник:

канд. біол. наук, доц. кафедри мікробіології,
вірусології та біотехнології

Лихолат Тетяна Юріївна

Завідувач випускної кафедри мікробіології,
вірусології та біотехнології, канд. біол.
наук, доцент

Скляр Тетяна Володимирівна

Дніпро 2024

РЕФЕРАТ

Кваліфікаційна робота «Використання ультразвукового та ензиматичного методів дезінтеграції для отримання імуномодельючих біотехнологічних препаратів на основі лактобацил» містить 41 стор., 3 рис., 3 табл., 41 літературних джерел.

Предмет дослідження – штами молочнокислих бактерій *Lactobacillus bulgaricus* із пробіотика «Гастрофарм».

Об'єкт дослідження – ультразвуковий та ензиматичний методи дезінтеграції для отримання фрагментів клітинних стінок *Lactobacillus bulgaricus* з антигенними властивостями.

Метою роботи стала оцінка впливу ультразвукового та ензиматичного методів дезінтеграції клітинної стінки пробіотичних штамів лактобацил на її імуномодулюючі властивості.

Методи дослідження: мікробіологічні, мікроскопічні, імунологічні.

Одержані висновки та їх новизна: за результатами світлової мікроскопії встановлено, що для отримання імуномодулюючого препарату на основі клітинних стінок бактерій *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* оптимальний час ультразвукової і ензиматичної дезінтеграцій клітин відповідно становив 20 і 30 хв. При внутрішньочеревному введенні білим лабораторним мишам отриманих препаратів на основі клітинних стінок бактерій *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* за методами ультразвукової і ензиматичної дезінтеграцій встановлено достовірне збільшення лейкоцитів периферичної крові відповідно на 8,4 і 15,9%, лімфоцитів – на 5,6 і 10,4%, активності фагоцитів крові – на 3,1 і 3,7% порівняно з контролем.

Перелік ключових слів: *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*, УЛЬТРАЗВУК, ФЕРМЕНТИ, ДЕЗІНТЕГРАЦІЯ, КЛІТИНИ КРОВІ, МИШІ.

RESUME

The graduation research of the student Samuilova K. A. (DNU, Department of Microbiology, Virology and Biotechnology) deals with the working out of scheme and selection of methods for the receipt of probiotic preparations from *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* and researching of its influence on the immunological blood indexes of white mice.

This work has been microbiological, microscopic, immunologic and statistic methods of investigation.

It was established on results a light microscopy, that for the receipt of immunobiologic preparations of cellular walls of *Lactobacillus bulgaricus* the optimal time of ultrasonic and enzyme disintegrations of cells accordingly presented 20 and 30 min. At intra-abdominal introduction to the white laboratory mice of immunobiologic preparations of cellular walls of *Lactobacillus bulgaricus* after the methods of ultrasonic and enzyme disintegrations it was marked the reliable increase of leucocytes on 8,4 and 15,9% accordingly, lymphocytes – on 5,6 and 10,4%, and activity of blood phagocytes – on 3,1 and 3,7% comparatively with control.

The work has theoretical and practical interest for biotechnologists, microbiologists and immunologists.

Bibliography 41. Tables 3. Illustrations 3. Pages 41.

ЗМІСТ

ВСТУП.....	5
Розділ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ.....	7
1.1 Біологічні властивості <i>Lactobacillus bulgaricus</i>	7
1.2 Імуностимулюючі та імуномодулюючі препарати на основі лактобацил..8	
1.3 Методи дезінтеграції мікроорганізмів.....	14
Розділ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ.....	22
2.1 Методи отримання біомаси <i>Lactobacillus bulgaricus</i>	22
2.2 Виділення фрагментів клітинних стінок <i>Lactobacillus bulgaricus</i> за допомогою метода ультразвукової дезінтеграції.....	23
2.3 Ферментаційний метод отримання фрагментів клітинних стінок <i>Lactobacillus bulgaricus</i>	24
2.4 Осадження клітинних стінок за методом диференціального центрифугування.....	24
2.5 Методи вивчення впливу фрагментів клітинних стінок лактобацил на деякі імунологічні показники крові білих лабораторних мишей.....	25
Розділ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ.....	29
3.1 Отримання фрагментів клітинних стінок <i>Lactobacillus</i> <i>delbrueckii subsp. bulgaricus</i> за різних методів дезінтеграції.....	29
3.2 Вивчення впливу фрагментів клітинних стінок лактобацил на деякі імунологічні показники крові білих лабораторних мишей.....	32
ВИСНОВКИ.....	37
ПЕРЕЛІК ПОСИЛАНЬ.....	38

ВСТУП

Одним з перспективних напрямків сучасної біотехнології є отримання імунобіологічних препаратів на основі молочнокислих бактерій [6, 7]. Останнім часом всебільшу увагу приділяють компонентам клітинних стінок лактобацил, серед яких особливе місце займають тейхоєві кислоти і фрагменти клітинних стінок з вираженою імуностимулюючою дією. З літературних даних відомо, що дані біополімери можуть впливати на клітини, тканини, імунну систему теплокровних тварин і людини, а також приймати участь у багатьох біологічних процесах. Особливий інтерес мають тейхоєві кислоти і фрагменти клітинних стінок пробіотичних бактерій, їх функціональна роль і здатність взаємодіяти з рецепторами еукаріотичних клітин [20].

В останні роки на фармацевтичному ринку України з'явився цілий ряд таких «природних» імуностимуляторів. Серед них найвідомішими є "Ліастен" – глюкозамінілмураміддипептид клітинних стінок *Lactobacillus delbrueckii*, розроблений колективом вчених і практиків ДП "ЕНЗИМ" (м. Ладизин, Вінницька область, Україна) [9] та «Лікопід», що представляє собою комплекс фрагментів оболонки клітин молочнокислих бактерій, розроблений в Інституті Біоорганічної Хімії ім. М.М. Шемякіна і Ю.А. Овчинникова РАН [20]. Препарати мають позитивну дію на всі основні популяції клітин імунної системи (макрофаги, Т- і В-лімфоцити), підвищують активність лізосомних ферментів, продукцію активних форм кисню і, як наслідок, цитотоксичний ефект макрофагів у відношенні до бактеріальних антигенів, вірусифікованих та пухлинних клітин тощо.

Дослідження компонентів клітинних стінок пробіотичних бактерій, на основі яких розробляються подібні імуностимулюючі препарати, передбачає отримання їх в нативній формі для проведення біохімічного аналізу і дослідження біологічної активності [34]. Тому методи дезінтеграції клітин не повинні впливати на досліджені біомолекули [41].

У зв'язку з цим метою роботи стала оцінка впливу ультразвукового та ензиматичного методів дезінтеграції клітинної стінки пробіотичних штамів лактобацил на їх імуномодулюючі властивості.

Для досягнення мети в роботі вирішувались такі задачі:

- отримати фрагменти клітинних стінок *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* з пробіотичного препарату «Гастрофарм» за допомогою методу ультразвукової дезінтеграції;
- отримати фрагменти клітинних стінок *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* з пробіотичного препарату «Гастрофарм» за допомогою методу хімічної дезінтеграції;
- порівняти ефективність використаних дезінтегративних методів при дослідженні впливу отриманих фрагментів клітинних стінок на деякі імунологічні показники крові білих мишей.

Розділ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1 Біологічні властивості *Lactobacillus bulgaricus*

Лактобацили – мікроаерофільні, грампозитивні бактерії, що не утворюють спор і не синтезують каталази. За здатністю синтезувати вуглекислоту з глюкози, потреби в тіаміні, ферментації фруктози і синтезу фруктозодифосфатальдолази вони діляться на дві групи: гомо- і гетероферментативні. Лактобактерії зазвичай мають правильну форму довгої «палички», іноді кокковидної, розташовуються в коротких ланцюжках або поодиноці. У процесі свого нормального метаболізму лактобактерії здатні утворювати молочну кислоту, перекис водню, продукувати лізоцим та речовини з антибіотичною активністю: реутерін, плантаріцин, лактоцидін, лактолін [2].

Lactobacillus bulgaricus – унікальна бактерія, що суттєво відрізняється від інших молочнокислих бактерій. У природних умовах зустрічається в корінні і в корі дуба, в квіточках болгарської троянди, кізилу звичайному тощо. Потрапляючи з їжею до товстої кишки людини, вона швидко розмножується і на протязі декількох годин досягає сотні мільйонів клітин на 1 г маси. На відміну від інших пробіотичних бактерій, як *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium*, *Lactobacillus bulgaricus* не є постійним мешканцем товстої кишки людини [3]. Якщо вона не вноситься постійно в організм, через 10 - 15 днів зникає з нього.

Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus (раніше лат. *Lactobacillus bulgaricus*, болгарська паличка) – підвид *Lactobacillus delbrueckii* type, одна з двох бактерій, що використовується для виробництва йогурту. Названа на честь Болгарії, в якій вона була вперше відкрита і використана. Бактерію вперше відкрив болгарський студент медицини Стам Григоров в 1905 р. при дослідженні мікрофлори йогурту.

Lactobacillus bulgaricus – нерухомі, неспороутворюючі грампозитивні бактерії розміром 0,5-0,8 x 2,0-9,0 мкм. Хемоорганогетеротрофи,

мікроаерофіли. Енергію отримують в результаті гомоферментативного молочнокислого бродіння. Для росту на живильних середовищах потребують фактори росту і вітаміни. Мають набір протеаз, які беруть участь у дозріванні деяких сортів сирів, специфічна пептидаза *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* – пролідаза – гідролізує білки з високим вмістом проліну і має унікальні шляхи регуляції біосинтезу [6]. Імуностимулюючу дію лактобактерій пов'язують з присутністю в їх клітинній стінці пептидогліканів і тейхоєвих кислот – відомих поліклональних індукторів та імуномодуляторів [20, 34, 41].

Lactobacillus bulgaricus синтезує позаклітинні полісахариди, що покращують структуру, підвищують стабільність і запобігають синерезису йогурту. Вона також проявляє імуностимулюючу дію при проходженні через шлунково-кишковий тракт [7].

Геном *Lactobacillus delbrueckii subsp. Bulgaricus* представлений кільцевою дволанцюговою молекулою ДНК розміром 1864998 п. н. і містить 2217 генів, з яких 1562 кодують білки, відсоток Г + Ц пар становить 73%. [2, 14].

На відміну від інших пробіотичних лактобацил, під час молочнокислого бродіння *Lactobacillus bulgaricus* синтезує D(-)молочну кислоту, яка визначає її потужний антираковий, лучезахисний та антиоксидантний ефект [40].

1.2 Імуностимулюючі та імуномодулюючі препарати на основі лактобацил

Всі імуностимулюючі і імуномодулюючі препарати можна поділити на три групи: 1) пробіотики – живі мікроорганізми та речовини мікробного походження, які приводять до поліпшення фізіологічних, біохімічних та імунних реакції макроорганізму шляхом оптимізації його мікробіологічного статусу. 2) Пребіотики – метаболіти мікроорганізмів, які стимулюють ріст і метаболічну активність однієї або декількох груп нормальної мікрофлори

макроорганізму. 3) Синбіотики – препарати, які отримані в результаті раціональної комбінації пре- і пробіотиків [35].

На всесвітньому фармацевтичному ринку найбільш поширеними є пробіотичні препарати [1, 9, 25]. Їх розділяють на: пробіотики на основі живих мікроорганізмів (монокультури або їх асоціації); пробіотики на основі метаболітів або структурних компонентів мікроорганізмів – представників нормальної мікрофлори; пробіотики на основі сполук мікробного або іншого походження, що стимулюють ріст і активність біфідобактерій і лактобацил – представників нормальної мікрофлори; пробіотики на основі комплексу живих мікроорганізмів, їх структурних компонентів, метаболітів в різних поєднаннях, що стимулюють ріст представників нормальної мікрофлори; пробіотики на основі генно-інженерних штамів мікроорганізмів, їх структурних компонентів і метаболітів із заданими характеристиками; пробіотичні продукти харчування на основі живих мікроорганізмів, їх метаболітів та інших сполук мікробного, рослинного або тваринного походження, здатних підтримувати і відновлювати імунний статус організму через корекцію мікробіоценозу організму хазяїна [4].

Найчастіше, для приготування пробіотичних препаратів використовують бактерії: *Bacillus subtilis*; *Bifidobacterium adolescentis*, *B. bifidum*, *B. breve*, *B. infantis*, *B. longum*; *Enterococcus faecalis*, *E. Faecium*; *Escherichia coli*; *Lactobacillus acidophilus*, *L. casei*, *L. delbrueckii subsp. bulgaricus*, *L. helveticus*, *L. fermentum*, *L.lactis*, *L.rhamnosus*, *L. salivarius*, *L. plantarum*; *Lactococcus spp.*; *Leuconostoc spp.*; *Pediococcus spp.*; *Propionibacterium acnes*; *Saccharomyces boulardii*; *Streptococcus cremoris*, *S. lactis*, *S. salivarius subsp. thermophilus*; *Clostridium butiricum* [10, 12, 39].

Залежно від технології виробництва сучасні пробіотики можна розділити на дві групи. Перша група пробіотиків виробляється з використанням методу ліофільного сушіння субстрату живих активних живих бактерій. Препарати випускають у формі порошку, таблеток, капсул або свічок. Ці форми мають тривалі терміни придатності і не вимогливі до нетривалих змін температури

зберігання. Істотним їх недоліком є те, що процес ліофілізації призводить до явища анабіозу бактерій, які входять до складу препарату. Для повернення в активний фізіологічний стан їм потрібно 8-10 годин, а за цей час вже велика частина бактерій виводиться з організму людини. Крім того, в процесі ліофілізації бактеріальні клітини втрачають специфічні рецептори, які допомагають їм закріплюватися на слизовій оболонці, наприклад, кишечника [19]. При виробництві другої групи – рідких «живих» пробіотиків мікробні клітини залишаються в активному стані і здатні до колонізації шлунково-кишкового тракту вже через дві години.

Передусім найбільшою перевагою на ринку пробіотичних препаратів користуються пробіотики на основі лактобактерій. Нижче описані найбільш відомі з них.

Біовестін-лакто містить штам *Lactobacillus plantarum* 8P A3 і 2 штами біфідобактерій – *Bifidobacterium bifidum* 792 і *B. adolescentis* MC-42, що мають високу антагоністичну активність щодо умовно-патогенних і патогенних мікроорганізмів і стійкість до терапевтичних доз найбільш поширених антибіотиків [15].

Лінекс – виготовлений на основі трьох видів бактерій: *Bifidobacterium infantis var. liberorum*, *Lactobacillus acidophilus* і *Enterococcus faecium* SF68, ліофільно висушених і розфасованих в капсули. В одній капсулі міститься не менше $1,2 \times 10^7$ КУО кожного штаму. Лінекс застосовується при гострих кишкових інфекціях вірусної та бактеріальної природи, хронічних захворюваннях шлунково-кишкового тракту, що протікають з явищами дисбактеріозу кишечника [27].

Біфіліз – препарат, який містить життєздатні біфідобактерії в дозі 10^8 КУО і 10 мг лізоциму. Оптимальне поєднання біфідобактерії і лізоциму підсилює лікувальну дію кожного компонента в препараті і дозволяє застосовувати його при більш важких формах захворювання та обмежити застосування антибіотиків для лікування кишкових інфекцій. Призначають дітям з перших днів життя і дорослим при дисбактеріозах, гострих кишкових

інфекціях і хронічних захворюваннях різної етіології. Особливо препарат показаний ослабленим, недоношеним дітям з обтяженим преморбідним фоном, за наявності змішаної патології (інфекційно-запальні захворювання, загроза сепсису, гіпотрофія, анемія), при вторинних імунодефіцитних станах, у тому числі після терапії цитостатиками або антибіотиками широкого спектра [29].

Ацилакт – препарат, що являє собою ліофілізовану мікробну масу *L. acidophilus*. Одна доза містить не менше 10^8 КУО лактобацил. Препарат має коригуючу дію при порушеннях нормальної мікрофлори ротової порожнини, шлунково-кишкового і уrogenітального трактів. Ацилакт призначають при затяжних і хронічних колітах і ентероколітах інфекційної і неінфекційної етіології, що супроводжуються дисбактеріозом, при неспецифічному виразковому коліті у дорослих [30].

Екофлор – унікальний комплекс біфідо- і лактобактерій, іммобілізованих на ентеросорбенти СУМС-1. Комплекс має імуностимулюючу активність, позитивно діє на організм при хронічних захворюваннях. Вони забезпечують нормальну роботу шлунково-кишкового тракту, сприяючи синтезу і засвоєнню вітамінів, особливо групи В, і антибіотикоподібних речовин, що гальмують зростання патогенних мікроорганізмів [32].

Дослідження італійського вченого S. Bianchi (1999) показують, що в порівнянні з іншими пробіотичними бактеріями, *Lactobacillus bulgaricus* найкраще адгезується до слизу товстої кишки і швидко розмножується в організмі, що визначає її потужний оздоровчий, імуностимулюючий і детоксичний ефект у порівнянні з іншими пробіотичними бактеріями. Потрапляючи в організм людини, *Lactobacillus bulgaricus* стимулює розвиток інших пробіотичних бактерій, таких, як *Lactobacillus acidophilus*, *L. lactis*, *Bifidobacterium* та ін. Без *Lactobacillus bulgaricus* розвиток інших пробіотичних мікроорганізмів складний і їх корисні ефекти мінімальні [1].

Розробка перших пробіотичних продуктів з *Lactobacillus bulgaricus* розпочата колективом учених під керівництвом проф. Н. Александрова [10].

Використання *Lactobacillus bulgaricus* у складі болгарського кислого молока для лікування діареї у дітей – споконвічна традиція в Болгарії. У 1945 р. доктор А. Фіков повідомив про успішне лікування дитячої діареї болгарським кислим молоком, використаним для клізм в дитячих клініках в Берліні і Софії. Пізніше G. Vaudra (1990) і P.Solis (1993) публікують схожі результати успішного лікування дитячої діареї за допомогою *Lactobacillus bulgaricus*. Її прийом призводив до збільшення кількості муцину в тонких кишках. Пробиотик перешкоджав розвитку вірусів (найбільш часті з яких ротавіруси), швидко усуваючи їх з кишкового тракту. *L. bulgaricus* синтезує у великій кількості TNF α речовину, що стимулює неспецифічну імунну відповідь і γ -інтерферон, який блокує розмноження вірусів [32].

Найбільш відомі пробиотики на основі *Lactobacillus bulgaricus*, це: саногастрит, йогулакт, віта баланс, гастрофарм та ін.

Сано-гастрит розроблений на основі *Lactobacillus bulgaricus* 51. До складу також входять соя та інші мікроелементи. Сано-гастрит, отриманий в результаті ферментації бактерій *Lactobacillus bulgaricus* 51 та екстракту сої, багатий специфічними натуральними субстанціями, добре впливає на функціональний стан слизової оболонки шлунка і дванадцятипалої кишки. Сано-гастрит багатий малими пептидами і поліпептидами, жирними ненасиченими кислотами, вітамінами С, РР та ін., мінеральними солями і мікроелементами, рослинними волокнами і полісахаридами, тобто всіма необхідними біологічними елементами, що сприяють хорошій роботі шлунково-кишкового тракту [38].

Вітабаланс 3000 – натуральний комплекс молочнокислих бактерій. В одній кислотостійкій капсулі міститься більше одного мільярду живих бактерій, вирощених на моркв'яній основі, яка є натуральним живильним середовищем. Вітабаланс 3000 може бути використаний пацієнтами з непереносимістю молочних продуктів [10]. Рівновагу в середовищі мікроорганізмів давно визнано найважливішою складовою здоров'я людини. Вітабаланс 3000 забезпечує нормальну мікрофлору в кишечнику; зміцнює

захисні сили організму; нейтралізує дію харчових, лікарських та токсичних елементів; знімає інтоксикації, в тому числі і при вагітності; регулює роботу кишечника, покращує процеси засвоєння і всмоктування поживних речовин організмом, покращує засвоюваність мікроелементів, покращує роботу шлунка, загоєння виразок, ерозій, покращує роботу печінки, нирок, нервової системи; знижує ризик онкозахворювань. Показання: дисбактеріоз, хронічні порушення травлення (запор, діарея, ферментопатія, метеоризм, коліт) і хронічні захворювання шлунково-кишкового тракту, інтоксикації, алергія, тривалий прийом антибіотиків, знижений імунний статус, гемофілія, діабет.

До складу препарату входять: *Lactobacillus acidophilus*, *L. bifidus*, *L. rhamnosus*, *L. plantarum*, *L. salivarius*, *L. bulgaricus*, *L. lactis*, *L. casei*, *L. brevis*, моркв'яний порошок [4].

Гастрофарм. Висушені життєздатні клітини *L. bulgaricus* штам 51 (LB-51) і біологічно активні продукти їх життєдіяльності. Дія препарату забезпечується наявністю *L. bulgaricus* і біологічно активних продуктів їх життєдіяльності (молочна і яблучна кислота, нуклеїнові кислоти, ряд α -амінокислот, поліпептиди і полісахариди), а також високим вмістом білків (25-30%), які надають гастропротекторну дію. Гастрофарм стимулює процеси регенерації в слизовій оболонці шлунково-кишкового тракту, нормалізує функцію шлунка і кишечника, регулює рівновагу кишкової мікрофлори. Показання – гострий і хронічний гастрит, що супроводжується підвищеною кислотністю шлункового соку; виразкова хвороба шлунка та дванадцятипалої кишки; гастропротекція під час і після лікування препаратами, що мають подразнюючу дію на шлунково-кишковий тракт [12].

Ліастен. Провідне місце в медикаментозній імунотерапії займають препарати, отримані з використанням сучасних виробничих технологій. В останні роки на фармацевтичному ринку України з'явився оригінальний природний препарат "Ліастен", виділений з клітинних стінок *Lactobacillus delbrueckii*. "Ліастен" був розроблений великим авторським колективом вчених і практиків, захищений декількома патентами України, випускається

ДП "ЕНЗИМ" (м. Ладижин, Вінницька область, Україна) [9].

Встановлено, що препарат "Ліастен" має виражену імуномодулюючу дію, сприяє нормалізації порушених показників імунітету, лейкоцитів крові, має додатковий протипухлинний і антиметастатичний ефекти, виявляє радіопротекторні та антиоксидантні властивості, допомагає хворим на рак успішно пройти повний курс хіміотерапії і променевої терапії, збільшує тривалість і якість їхнього життя. "Ліастен" нетоксичний, добре переноситься хворими і практично не викликає побічних ефектів [20, 39].

1.3 Методи дезінтеграції мікроорганізмів

Під дезінтеграцією мікроорганізмів розуміють процес незворотного порушення анатомічної цілісності оболонки живої клітини. Цей процес є ключовою стадією виробництва ряду цінних біологічно активних речовин, які виділяються з клітини тільки після ушкодження її стінки [5].

Для руйнування (дезінтеграції) клітин застосовують цілий набір методів, які можна віднести до трьох основних груп: фізико-механічні, хімічні і ензиматичні (ферментні) методи. Всі процедури повинні бути досить жорсткими, щоб зруйнувати клітинну стінку, і в той же час досить м'якими, щоб виключити денатурацію або руйнування цільового продукту. [8].

До фізичних методів відносяться: руйнування клітин баллістичним способом із застосуванням бус Баллотіні, кварцового піску, розтирання клітин в дисковому млині, дроблення заморожених у рідкому азоті або в сухому льоді клітин; екструдкування клітин під високим тиском (2-5 атм) через вузьку щілину або отвір; газодекомпресійна дезінтеграція, заснована на створенні в камері з руйнівальним матеріалом високого тиску і швидким скиданням його, що призводить до розриву клітинних стінок; ультразвукова дезінтеграція [17].

Ензиматичні методи засновані на застосуванні літичних ферментів, що

руйнують клітинну стінку: лізоциму, що виділяється з білка курячих яєць і руйнує, головним чином, оболонки бактеріальних клітин; ферментного комплексу, що міститься в шлунковому соку равликів *Helix pomatia* або виділяється деякими видами актиноміцетів і лізує оболонки еукаріотичних клітин, зокрема грибів [18].

Хімічні методи дезінтеграції засновані на руйнуванні клітинної оболонки під впливом лугів, кислот, детергентів, інгібіторів синтезу оболонки клітини [16].

Вибір методу дезінтеграції визначається метою роботи. Для отримання внутрішньоклітинних ферментів найбільш прийнятні баллістичні та екструзійні способи, ензиматичні методи широко застосовують в наукових дослідженнях для виділення в цілості різних субклітинних структур (органел, мембран і т.д.), а також для отримання протопластів. Застосування хімічних методів дезінтеграції мікроорганізмів веде до порушення цілісності клітинних структур, інактивації ферментів. Тому хімічні методи зазвичай застосовують для отримання харчового дріжджового білку [28].

В результаті обробки клітинної біомаси по одному з методів дезінтеграції отримують гомогенат, що містить незруйновані клітини, оболонки зруйнованих клітин, обривки мембран, різні клітинні структури, які можуть бути відокремлені шляхом фільтрування. При цьому велика частина речовин – ендометаболітів переходить до культуральної рідини або розчину екстрагента [32]. Подальше виділення та очищення цільових продуктів з культуральної рідини або екстрактів залежить від їх хімічної і фізичної природи [36].

По стійкості до руйнування клітини різних мікроорганізмів можна розташувати в послідовності (в порядку зменшення): дріжджі; міцелій грибів; грампозитивні коки; грампозитивні палички; грамнегативні палички; галобактерії; мікоплазми [17, 24].

Спосіб руйнування клітин вибирають в основному емпірично залежно від виду клітин, потрібного обсягу екстракту, чутливості ферменту до

інактивації або зміни в процесі руйнування і необхідності подальшого зберігання. Часто це доводиться робити методом проб і помилок [18].

Найбільш м'яким з усіх механічних способів руйнування клітин є руйнування клітинної мембрани під дією гідростатичного (осмотичного) тиску. Для більшості бактерій цей метод непридатний, якщо не обробляти попередньо клітинні стінки ферментами або не змінювати їх структури іншими способами. Застосування осмотичного шоку виявилось дуже корисним при вивченні деяких «периплазматичних» ферментів грамнегативних бактерій [24]. Зазвичай, це гідролази, такі, як лужна фосфатаза, рибонуклеаза I і циклічна фосфодіестераза. Метод виділення цих ферментів з клітин *Escherichia coli*, описаний Хьюзом та ін. [5].

Цей метод заснований на дії тиску, що виникає під дією кристалів льоду всередині клітин або абразивного порошку на поверхні клітин. Прес Хьюза складається з пристрою для пропускання замороженої клітинної суспензії або пасти з клітин через невеликий отвір в приймальну камеру. Суспензію пропускають під високим тиском (6,8-107 – 54,4-107 Па), що створюється за допомогою гідравлічного пресу [8].

Руйнування клітин в замороженому вигляді за допомогою преса Хьюза – один з найбільш ефективних способів руйнування клітинного матеріалу різного походження – від бактеріофагів до тваринних тканин. За його допомогою можна руйнувати клітини бактерій, які зазвичай важко піддаються дезінтеграції (наприклад, клітини грампозитивних коків) [32].

Після преса Хьюза фізичні методи руйнування клітин можна класифікувати наступним чином в порядку зменшення їх дезінтегруючої дії: вібраційні млини – прес Френча – ультразвук – розтирання з гранулами окису алюмінію (чи будь-яким іншим абразивом).

Найбільш часто використовуються вібраційні млини марки Mickle (Mickle Ltd., Mill Works, England) і Nossal (McDonald Engineering Co., Bay Village, Ohio). За цим методом до суспензії клітин додають дрібні скляні кульки (Superbrite glass beads, Ballotini Beads, England) і суміш поміщають в

скляну або металеву капсулу. Для оптимального руйнування емпірично підбирають співвідношення кількості кульок і клітин, що зазвичай дорівнює 1:1. Об'єм суміші, як правило, не перевищують 25 мл. Час струшування також підбирається емпірично. Для обробки за допомогою млина Mickle потрібне тривале струшування. Менший час витрачається при роботі з млином Nossal з підвищеною вібрацією. Під час струшування утворюється тепло, тому застосовують холодильну систему. Для охолодження млина Nossal, наприклад, використовують систему з обробкою ультразвуком [16].

Прес Френча – дуже ефективний пристрій для руйнування клітин багатьох видів мікроорганізмів. У продажу є багато варіантів цього пристрою. Найпростіший з них складається з камери, вміщеній в лабораторний гідравлічний прес, здатний створювати загальний тиск 10-20 т. В камеру вносять клітинну суспензію, яку піддають дії поршня. Клітини ефективно руйнуються при виході суспензії під тиском з маленького отвору камери. Однією рукою можна регулювати тиск гідравлічного преса, а інший швидкість виштовхування клітин через голчастий клапан. У продажу є пристрій з автоматичним гідравлічним пресом (American Instrument Co., Silver Spring, MdL), а також вдосконалений варіант цього пристрою (Sorvall - Ribl Fractionator, Ivan Sorvall Inc., Norwalk, Conn.) [18].

Попередньо охолоджений прес Френча заповнюють суспензією клітин. Поршень заздалегідь встановлюють таким чином, щоб об'єм камери дорівнював 5, 10, 20 або 50 мл. Систему встановлюють (з поршнем в нижньому положенні) на спеціальний штатив, додають трохи надлишкової кількості суспензії клітин і відкривають голчастий клапан, щоб при закриванні кришки камери надлишкова рідина виліталася через отвір. (Це забезпечує витіснення повітря з камери і запобігає виходу стисненого повітря разом з останньою порцією суспензії.) Закривають голчастий клапан і зібраний апарат поміщають (з поршнем в нижньому положенні) на гідравлічний прес. Подають тиск $6,8 \times 10^7 - 20,4 \times 10^7$ Па і підтримують його

на постійному рівні під час повільного просочування суспензії через з'єднану з отвором трубку до відповідно охолодженого приймача [24].

За цим методом можна руйнувати більшість бактерій, навіть ті, які руйнуються найважче, наприклад мікобактерії. Суспензію грамнегативних коків часто потрібно пропускати через прес повторно. Крім того, що цей спосіб руйнування дуже зручний і ефективний, він має ще одну перевагу, при його використанні інактивація ферментів мінімальна.

Рекомендується використовувати відносно густі суспензії клітин – близько 0,5 г клітин (сирої ваги) або більше в 1 мл. У густих суспензіях руйнування клітин відбувається краще, а інактивація ферментів менше, ніж у розбавлених [5].

Ультразвукова дезінтеграція. Під дією ультразвукового поля клітини відчувають позмінне стиснення і розтягування, скручування в різних напрямках, що, врешті-решт, призводить до розриву клітинної стінки і її руйнування. Операція дезінтеграції за допомогою ультразвуку може здійснюватися як у періодичному, так і в безперервному режимах [36].

Біологічній дії ультразвуку присвячена велика кількість досліджень. Це пов'язано з тим, що при ультразвуковому опроміненні біооб'єктів виникають різні явища (диспергування, кавітація, термічна і окислювальна дія), які можуть робити істотний вплив на живі організми. Причинами змін, що виникають в біологічних об'єктах під дією ультразвуку, можуть бути вторинні ефекти фізико-хімічного характеру. Так, під дією акустичних хвиль відбувається енергійне перемішування внутрішньоклітинних мікроструктур, а кавітація в середовищі призводить до розриву молекулярних зв'язків. Ультразвукові низькочастотні поля прискорюють процеси дифузії, підвищують проникність клітинних оболонок. В результаті збільшується вихід білків, що використовується для отримання пептидів. Оскільки матеріал, що отримують, містить велику кількість білкових і біополімерних комплексів, виникають труднощі при отриманні високоочищених препаратів [37].

Даний технологічний прийом має переваги над іншими фізико-хімічними методами в тому, що не викликає денатурацію поліпептидних ланцюгів і зберігає нативність їх хімічної структури. Ступінь руйнівної дії ультразвуку залежить від його потужності, частотного діапазону, експозиції, а також від морфологічних і функціональних особливостей опромінених мікроорганізмів [17].

Як правило, ультразвукові коливання приводять бактеріальні клітини до загибелі, при цьому дана мікробна суспензія не втрачає своїх імуногенних і антигенних властивостей. Змінюючи інтенсивність ультразвуку можна домогтися зниження токсичності бактеріальної суспензії, зберігаючи її антигенність. Ці позитивні якості ультразвуку використовують у наукових розробках для отримання високоефективних бактеріальних вакцинних препаратів. Окремим напрямком вивчення застосування ультразвукового фактора є розробка методів дезінтеграції мікроорганізмів для отримання імунобіологічних препаратів [36].

Дослідниками дана позитивна оцінка методу виділення білкових антигенів з патогенних і не патогенних трепонем за допомогою ультразвукової дезінтеграції. У антигенному відношенні зазначені клітинні фракції виявилися більш перспективними, ніж білки, отримані за допомогою рекомбінантного методу. Використання їх дозволило підвищити чутливість тест-системи до 99,3%. Ультразвукові коливання успішно застосовують також для отримання білкових антигенів з таких бактерій як *Bacillus subtilis*, *Halobacterium halobium*, *Methylobacillus flagellatum*. Фізичні методи отримання антигенів приваблюють дослідників простими технологіями, які легко піддаються стандартизації. Низькочастотне озвучування (22 кГц і 44 кГц) клітин *E.coli* при температурі 2-4 °С протягом 5 хв у режимі впливу з тридцятисекундною паузою з наступним хроматографічним поділом отриманих фракцій дозволило отримати ендотоксин [24].

Руйнування клітин ультразвуком обумовлено кавітаційними силами, створюються ударні хвилі або кавітаційні мікропотоки, що сприяють

хімічній атаці вільними радикалами. Яким би не був механізм дезінтеграції, ультразвукова обробка – дуже ефективний засіб руйнування бактеріальних клітин. У продажі є різні ультразвукові дезінтегратори. Хоча можна обробляти і відносно густі суспензії клітин, ефективність руйнування у в'язких розчинах значно знижується. У міру виходу великих молекул, наприклад ДНК, суспензія стає більш в'язкою і руйнування клітин погіршується. Більше розбавлені клітинні суспензії швидше руйнуються ультразвуком. Час обробки зазвичай визначають емпірично, враховуючи необхідність відведення тепла, що виділяється, а також чутливість ферментів до інактивації [17].

Розтирання клітин з гранулами окису алюмінію - це один з найбільш дешевих способів руйнування бактерій. Для нього необхідні лише ступка, пестик і порошок окису алюмінію (наприклад Polishing Alumina, grade A-301, Fischer Scientific Co.). Окис алюмінію промивають і висушують при 100°C. Заморожений (або охолоджений) осад клітин поміщають в охолоджену ступку. Співвідношення охолодженого окису алюмінію і клітинної маси – 1:2 (по вазі). Енергійно розтирають суміш 2-5 хв. За цей час порошкоподібна суміш перетворюється в липку, клеєподібну масу, що свідчить про руйнування клітин. Додають буфер, ресуспендують вміст ступки і центрифугують його для видалення окису алюмінію і незруйнованих клітин. Цим способом можна швидко зруйнувати відносно велику кількість клітин. Більшість бактерій, проте, ефективніше руйнується іншими методами [17].

Обробка сумішшю лізоцим – ЕДТА також є прекрасним способом швидкого і м'якого лізису клітин. Її проводять при низькій або кімнатній температурі у осмотично щадному середовищі (для того, щоб не відбулося повного руйнування клітин). При цьому утворюються сферопласти. У такий спосіб можна одночасно обробляти до 30л клітин. За допомогою цієї м'якої обробки можна виділити усю фракцію полірибосом. Для оптимального руйнування клітин бактерій різних видів використовують різні концентрації розчинів буфера, ЕДТА і лізоцима.

М'яка осмотична обробка застосовується також при виділенні протопластів і мембранних везикул грампозитивних бактерій. Виділені з її допомогою препарати надзвичайно корисні при вивченні транспорту речовин через бактеріальну мембрану [17].

Для отримання сферопластів дріжджів суспензії їх клітин можуть бути візовані за допомогою препарату ферментів, що виділений з вмісту шлунку виноградного равлика. Такий фермент протягом короткого часу при 37-40⁰С лізує, наприклад, клітинну стінку дріжджів роду *Saccaromyces*. Препарат ферменту готують в лабораторії із свіжозібраних равликів і зберігають у замороженому стані [24].

Це найбільш м'який і швидкий спосіб руйнування клітин у порівнянні з іншими методами (займає 20-90 хв часу), але використовується лише для організмів без клітинної стінки. Перед лізисом клітини промивають декілька разів забуференим сольовим розчином (наприклад, 10 мМ трис-НСl, рН 7,5 зі 150 мМ NaCl). Після центрифугування біомасу суспендують до щільності 10⁸ кл/мл у тому ж буфері з додаванням тритону X-100. Вміст перемішують і інкубують на льоду від 10 до 90 хв. Замість тритону X-100 можуть бути використані й інші неіонні детергенти. Лізис клітин органічними розчинниками використовують для мікроорганізмів, осаджених на фільтрах з метою проведення реакцій з антитілами чи гібридизації з пробами нуклеїнових кислот. Для проведення такої обробки використовують невисокі концентрації толуолу (0,1-1,0%) у відповідному буфері [24].

Розділ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1 Методи отримання біомаси *Lactobacillus bulgaricus*

Предметом дослідження були молочнокислі бактерії *Lactobacillus bulgaricus*, виділені з пробіотичного препарату «Гастрофарм».

Об'єктом дослідження було підбір та оптимізація методів отримання фрагментів клітинних стінок *Lactobacillus bulgaricus* з антигенними властивостями.

Молочнокислі бактерії оживляли і надалі вирощували на рідкому живильному середовищі МРС, насупного складу (г): гідролізат казеїну – 10,0 г; м'ясний екстракт – 10,0 г; дріжджовий екстракт – 5,0 г; глюкоза – 20,0 г; ацетат натрію – 5,0 г; цитрат амонію двузаміщений – 2,0г; твін-80 – 1,0 г; фосфат калію двузаміщений – 2,0 г; сульфат магнію семиводний – 0,2г; сульфат мангану чотириводний – 0,05; вода дистильована – 1000 мл [24].

Для проведення методів дезінтеграції *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* вирощували в рідкому середовищі МРС протягом 12-16 год при температурі 37⁰С до моменту досягнення культурою стаціонарної фази росту. Кривої росту не будували, спираючись на відомі літературні дані щодо фізіології росту молочнокислих бактерій роду *Lactobacillus* [16]. Потім суспензію клітин штаму *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* засівали на тверде середовище МРС і культивували 12-16 год при температурі 37⁰С. Надалі проводили змив агаризованої культури 0,04М трис-НСІ-буфером, що містив 0,001М сульфат магнію, центрифугували два рази і ресуспендували в трис-НСІ-буфері. Далі знову центрифугували. Відкидали надосадову рідину, а з осаду отримували біомасу *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* (1г сирої біомаси). Для проведення методу ультразвукової дезінтеграції осад розводили буфером так, щоб кількість клітин була близько 10⁹ у мл.

2.2 Виділення фрагментів клітинних стінок *Lactobacillus bulgaricus* за допомогою метода ультразвукової дезінтеграції

Для руйнування клітин і отримання фрагментів клітинних стінок молочнокислої пробіотичної бактерії *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* використовували ультразвуковий дезінтегратор УЗДН-А.

Для проведення дезінтеграції колотий лід поміщали у широкий металевий посуд, у середину якого поміщали склянку із суспензією клітин штаму *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*, приготовану на трис-НСІ-буфері з концентрацією клітин близько 10^9 у мл. Мінімальний об'єм суспензії складав 30 мл.

Біомасу обробляли в режимі: акустична міцність випромінювача – 40 Вт/см², сила току – 0,28А, частота коливань становила 22 кГц, температура суспензії + 4⁰С, час обробки підбирали експериментально для досягнення кращих результатів. Він становив 10, 20 та 30 хвилин без перерви та з перервою в 1 хв через кожні 5 хв обробки [16].

У склянку з біомасою, що стоїть на льодовій бані, опускають стрижень дезінтегратора так, щоб його розширена частина повністю вкрита рідиною, але не торкалася дна. Включають прилад у електромережу, натискають кнопку «мережа», встановлюють експозицію в хвилинах кнопкою «min» і режим роботи таймера кнопкою «час». Ручкою «налаштування» встановлюють силу струму 0,28А і ручкою «інтенсивність» підбирають резонансну частоту випромінювача, попередньо натиснувши кнопку включення генератора для роботи в ручному режимі. Потім працюють в режимі автоматичного підлаштування частоти (кнопка «авт»). За включеного приладу зачиняють дверцята шумозахисної камери [18].

Після закінчення дезінтеграції ступінь руйнування клітин оцінюють за результатами світлової мікроскопії [16].

2.3 Ферментаційний метод отримання фрагментів клітинних стінок

Lactobacillus bulgaricus

Чашки з МРС засівали суспензією 12-16 год культури *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*. Штам інкубували при 37⁰С 12-16 год і змивали з чашок 0,04М трис-НСІ-буфером. Суспензію центрифугували при 5 тис. об/хв. 20 хв і ресуспендували у трис-НСІ-буфері і знов центрифугували у тому ж режимі. Для лізису клітини суспендували у ТЕ-буфері (50 мМ трис-НСІ рН 8,0 і 10 мМ ЕДТА) з розрахунку 3 мл буфера на 1 г сирої біомаси і нагрівали до 37⁰С. Потім додавали 1 мл розчину лізоциму (розчин приготовано на ТЕ-буфері, 10 мг/мл) на кожні 5 мл суспензії і інкубували 10, 20 та 30 хв при 37⁰С з легким похитуванням. Час гідролізу варіювали з метою встановлення оптимуму дії ферменту. Надалі з метою отримання фрагментів клітинних стінок суміш центрифугували спочатку для відділення незруйнованих клітин, а потім для отримання фрагментів клітинних стінок [24].

2.4 Осадження клітинних стінок за методом диференціального центрифугування

Для осадження незруйнованих клітин і клітинних стінок використовували метод диференціального центрифугування за допомогою ультрацентрифуги Optima L-90К з вугловим ротором, радіусом 7,16 см. Ультрацентрифуга Optima L-90К має наступні характеристики: максимальний об'єм 1500 мл, максимальне прискорення до 802000 x g і швидкість до 100000 об/хв.

Так як клітини осаджуються при 3-5 тис. g, а клітинні стінки при 20 тис. g, то було розраховано, що для осадження незруйнованих клітин *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* швидкість обертання центрифуги повинно становити 8 тис. об/хв, а для осадження клітинних стінок – 16 тис. об/хв. за часу центрифугування – 10 хв.

Для проведення центрифугування пробірки з дезінтегратором встановлюють у ротор друг проти друга, закривають кришку центрифуги. Включають центрифугу, встановлюють реле терморегулятора на 4°C і включають холодильник, встановлюють час – 10 хв, включають таймер, потім пускову кнопку і обертами рукоятки набирають необхідну кількість об/хв. Для осадження незруйнованих клітин виставляють 8 тис. об/хв. Через 10 хв. після зупинення центрифуги достають пробірки з ротора. Осад відкидають, а надосадову рідину зливають в ультрацентрифужні пробірки з гвинтами, врівноважують у закритому стані. Врівноважені пробірки поміщають до ротору друг проти друга, щільно закривають кришку ротора і кришку камери центрифуги. Включають водяне охолодження, включають кнопки «мережа» і холодильник. Встановлюють необхідну кількість об/хв., в нашому випадку 16 тис. об/хв. Для осадження клітинних стінок і кнопку «пуску». Після набору достатньої швидкості обертів встановлюють час центрифугування (10 хв) і включають таймер. Після зупинки центрифуги для автоматичного відкриття верхньої кришки камери центрифуги нажимають кнопку «гальма». Відключають центрифугу у зворотному порядку.

Осади клітинних стінок після центрифугування об'єднували і висушували [18].

2.5 Методи вивчення впливу фрагментів клітинних стінок лактобацил на деякі імунологічні показники крові білих лабораторних мишей

З метою дослідження впливу фрагментів клітинної стінки *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*, отриманих за різних методів дезінтеграції, готували розчини двох імуномодулюючих препаратів концентрацією 0,1 мкг/мл на 0,9% фізіологічному розчині. Таку концентрацію препаратів було приготовано після перерахунку дози і кількості введення препарату на масу миші.

Експеримент на тваринах проводили згідно норм, встановлених законом

України № 3447-IV “Про захист тварин від жорстокого поводження” та норм, прийнятих в Європейській конвенції по захисту хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та наукових цілей від 20.09.1985 [23].

Дослідження проведено на самицях безпородних лабораторних мишей віком 15 тижнів і масою 30 г. Тварини було поділено на групи. Першій групі внутрішньочеревно в об’ємі 0,2 мл вводили лише фізіологічний розчин. Другій групі – препарат з клітинних стінок *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* у концентрації 0,1 мкг/мл, приготований на 0,9% фізіологічному розчині, отриманих за методу ультразвукової дезінтеграції. Третій групі – препарат з клітинних стінок *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* у концентрації 0,1 мкг/мл, приготований на 0,9% фізіологічному розчині, отриманих за методу ферментативної дезінтеграції. Кількість мишей у кожній групі дорівнювало 5.

Через 7 днів у мишей всіх дослідних груп відбирали кров з бокової вени хвоста і визначали абсолютну кількість лейкоцитів (підраховували за допомогою камери Горяєва-Тома) та відносну кількість лімфоцитів (підраховували на мазках крові, пофарбованих за методом Романовського-Гімзе) [11, 21, 22]. Для підрахунку лейкоцитів у пробірку наливали 0,4 мл розчину 3–5% оцтової кислоти, підфарбованої метиленовим синім. Капілярною піпеткою набирали 20 мкл крові (розведення у 20 разів), видували її в пробірку з реактивом. Суміш перемішували і заповнювали камеру. Після заповнення її залишали на хвилину для осаду лейкоцитів. Підрахунок лейкоцитів вели за малого збільшення (об’єктив $\times 8$) при опущенні конденсору. Підрахунок лейкоцитів вели у 100 великих квадратах. Знаючи об’єм великого квадрата і ступінь розведення крові, знаходили кількість лейкоцитів в 1 мкл. Сторона великого квадрата дорівнює $1/5$ мм, площа – $1/25$ мм², об’єм простору над цим квадратом — $1/250$ мм³.

Формула для підрахунку лейкоцитів:

$$X = \frac{B \cdot 250 \cdot \Pi}{100}, X = \frac{B \cdot 250 \cdot 20}{100} = B \cdot 50 \text{ в 1 мкл}$$

де В – кількість лейкоцитів у 100 великих квадратах;

Π – ступінь розведення (20) [13].

Для визначення кількості лімфоцитів мазок крові робили на знежиреному предметному склі, його висушували на повітрі і фіксували в спирті впродовж 3-5 хв, потім мазок фарбували за Романовським – Гімзе впродовж 30-40 хв, після чого надлишки фарби змивали водопровідною водою і мазок висушували. Вивчення мазка проводили під мікроскопом (імерсійна система, об'єктив $\times 90$, конденсор має бути піднятий, а діафрагма повністю розкрита). У мазках лімфоцити – невеликі клітини (діаметром 7-12 мкм) з округлим або бобовидної форми компактним ядром, що займає більшу частину клітини. Цитоплазма, що забарвлюється в ніжно-блакитній колір, не має зернистості. Характерною рисою лімфоцита є світла зона навколо ядра.

Крім того вели підрахунок паличкоядерних і сегментоядерних нейтрофілів, моноцитів, а також базо- і еозинофілів.

Нейтрофіли – великі клітини (діаметром 10-15 мкм) з різко окресленим темним ядром. При фарбуванні за Романовським – Гімзе вони мають злегка рожевуватого кольору цитоплазму, заповнену дрібними зернятками рожевувато-фіолетового кольору. Сегментоядерні нейтрофіли мають ядро у вигляді 2-5 сегментів, зв'язаних один з одним тонкими нитками. Молоді форми нейтрофільних лейкоцитів – паличкоядерні нейтрофіли – мають ядро у вигляді палички або підкови, не розділене на окремі ділянки.

Еозинофіли – великі клітини з дво-, трилопатеvim ядром і з великою зернистістю в цитоплазмі. Діаметр клітини близько 15 мкм. При фарбуванні за Романівським зернистість набуває яскраво-червоного кольору еозину. Якщо препарат перефарбований, зерна набувають коричнево-червоного або коричневого кольору.

Базофіли – клітини діаметром 9–14 мкм з сегментованим ядром, частіше неправильної лопастної форми, інтенсивно забарвленим у темно-фіолетовий

колір. Цитоплазма базофілів заповнена крупними округлими чи полігональними гранулами, забарвленими за Романовским у синій колір [13].

Функціональну активність нейтрофілів крові досліджували за допомогою НСТ-тесту [26]. Для цього до 0,1 мл крові додавали 0,05 мл 0,2% розчину нітросинього-тетразолію у калій-фосфатному буфері (0,1М, рН 7,3) і 0,05 мл того ж буфера. Реакційну суміш термостатували на водяній бані при 37°C (30–60 хв), робили мазки, сушили на повітрі, фіксували в етиловому спирті (20 хв), дофарбовували водним розчином нейтрального червоного (0,1%, 20 хв) і мікроскопували з імерсією. Серед 100 клітин підраховували долю активованих нейтрофілів (ДАН, %), що містили гранули диформазама [13, 26].

Розділ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

3.1 Отримання фрагментів клітинних стінок *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* за різних методів дезінтеграції

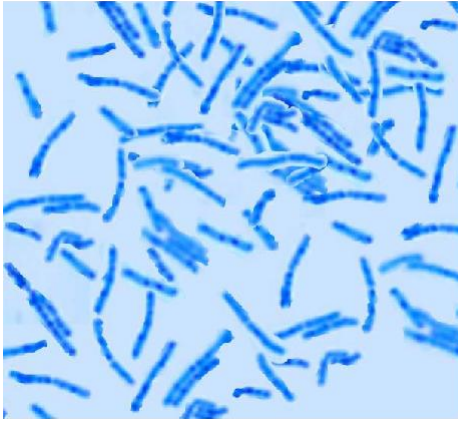
На першому етапі роботи необхідно було отримати клітинні стінки бактерій *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* за двома дезінтеграційними методами: при проведенні ензиматичного гідролізу і ультразвуку.

Для того, щоб отримати клітинні стінки дослідного штаму, які б після руйнування клітин зберігали свої антигенні властивості, час дезінтеграції варіювали від 10 до 30 хв як за ензиматичного гідролізу, так і за ультразвукової обробки. Ступінь руйнування культур оцінювали за допомогою методу світлової мікроскопії (рис 3.1 і 3.2). З рисунку 3.1 видно, що обробка ультразвуком протягом 10 хв. є недостатньою для руйнування всіх клітин у тій кількості біомаси, яку було взято для дезінтеграції. В той же час після проведення дезінтеграції клітин ультразвуком протягом 20 і 30 хв. в полі зору не було знайдено жодної цілої клітини лактобацил. Виходячи з отриманих результатів мікроскопії, можна зробити висновок, що оптимальним часовим режимом ультразвукової дезінтеграції для отримання непошкоджених фрагментів клітинних стінок лактобацил, які будуть зберігати свої антигенні властивості, є 20-хвилинна ультразвукова обробка.

Необхідно відмітити, що кращі результати при руйнуванні клітин низькочастотними коливаннями отримано за умов безперервного режиму дезінтеграції.

З рисунку 3.2 видно, що обробка лізоцимом протягом 10 або 20 хв. є недостатньою для руйнування всіх клітин у тій кількості біомаси, яку було взято для ензиматичного гідролізу. В той же час після проведення руйнування клітин лізоцимом протягом 30 хв. в полі зору не було знайдено жодної цілої клітини лактобацил. Виходячи з отриманих результатів мікроскопії, можна зробити висновок, що оптимальним часовим режимом

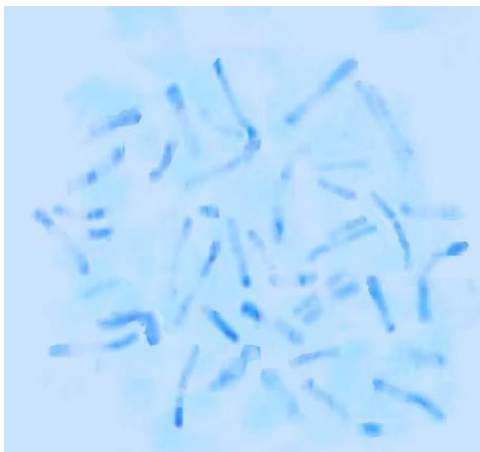
ензиматичного гідролізу для отримання непошкоджених фрагментів клітинних стінок лактобацил, які будуть зберігати свої антигенні властивості, є 30-хвилинна обробка лізоцимом.



а) до обробки ультразвуком,



б) після дезінтеграції протягом 10 хв.,



в) після дезінтеграції протягом 20 хв., г) після дезінтеграції протягом 30 хв.

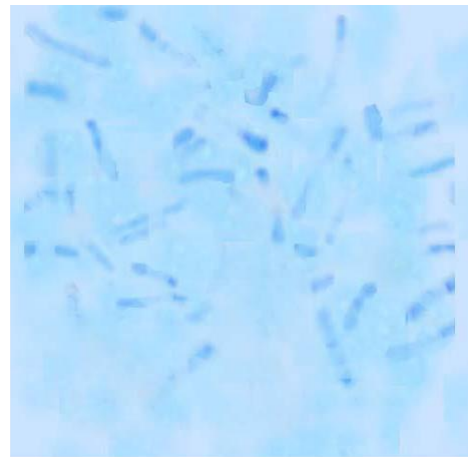
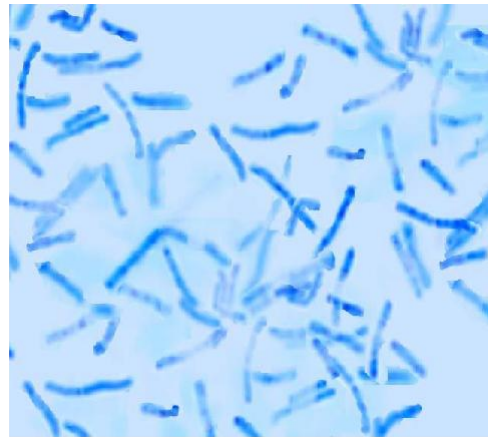
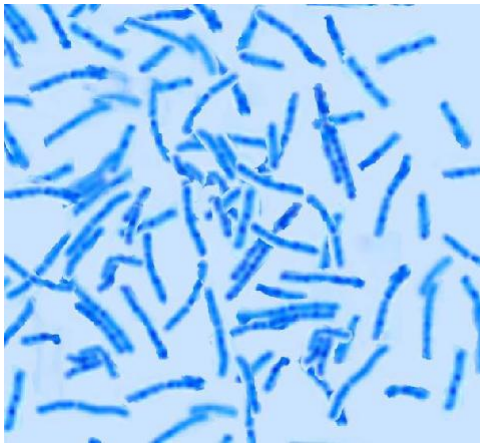


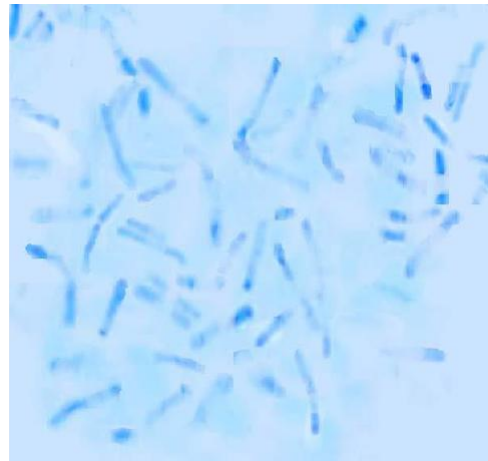
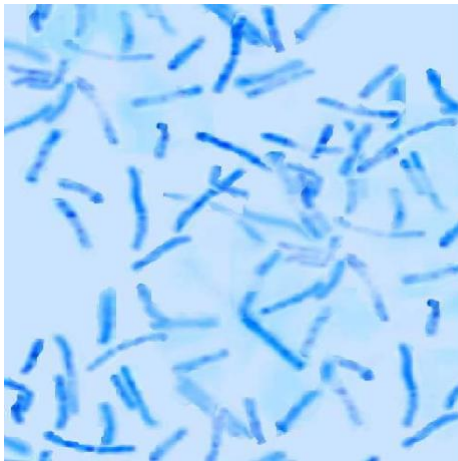
Рис. 3.1 Результати руйнування клітин *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* за дії ультразвуку (світлова мікроскопія)

Той факт, що для ефективного руйнування клітин штаму *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* застосовували тривалі часові режими дезінтеграції, можна пояснити тим, що, вірогідно, клітини лактобацил у даній фазі росту (стаціонарі) мають більш міцні клітинні стінки.



а) до ензиматичного гідролізу,

б) після дезінтеграції протягом 10 хв,



в) після дезінтеграції протягом 20 хв, г) після дезінтеграції протягом 30 хв.

Рис. 3.2 Результати руйнування клітин *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* за ензиматичного гідролізу (світлова мікроскопія)

Таким чином для другого етапу експерименту відбирали ті дезінтегровані зразки, при мікроскопії яких в полі зору вже не спостерігали наявності цілісних непошкоджених клітин. Тобто, для подальшого дослідження було обрано зразки, отримані після 20-хвилинної безперервної дезінтеграції ультразвуком і після 30-хвилинної витримки з лізоцимом.

Надалі проводили ультрацентрифугування дослідних зразків для осадження фрагментів клітинних стінок *Lactobacillus delbrueckii subsp.*

bulgaricus і для дослідження їх імуностимулюючих властивостей готували препарати у концентрації 0,1 мкг/мл на 0,9% фізіологічному розчині і вводили білим мишам.

3.2 Вивчення впливу фрагментів клітинних стінок лактобацил на деякі імунологічні показники крові білих лабораторних мишей

З метою дослідження впливу фрагментів клітинної стінки *Lactobacillus bulgaricus*, отриманих за різних методів дезінтеграції, на наступному етапі роботи готували розчини двох імуномодулюючих препаратів у концентрації 0,1 мкг/мл на 0,9% фізіологічному розчині (з розрахунку на масу миші).

Дослідження проведено на самицях безпородних лабораторних мишей віком 15 тижнів і масою 30 г. Тварини було поділено на 3 групи: першій групі вводили лише фізіологічний розчин; другій – препарат, отриманий за допомогою методу ультразвукової дезінтеграції; третій – препарат, отриманий за допомогою методу ферментативної дезінтеграції. Препарати (або фізіологічний розчин – контрольній групі) вводили внутрішньочеревно в об'ємі 0,2 мл. Кількість мишей у кожній групі дорівнювало 5. Дослід проводили трикратно.

Через 7 днів у мишей всіх дослідних груп відбирали кров з бокової вени хвоста, визначали абсолютну кількість лейкоцитів в крові (за допомогою камери Горяєва-Тома), кількість клітин лейкоцитів різних субпопуляцій і відносну кількість лімфоцитів (підраховували в мазках крові, пофарбованих за методом Романовського-Гімзе) [13]. Функціональну активність нейтрофілів крові досліджували за допомогою НСТ-тесту [26].

Через 7 діб після введення препаратів тваринам спостерігали достовірне збільшення кількості лейкоцитів та лімфоцитів у сироватці крові дослідних груп мишей порівняно з контролем. У дослідній групі мишей, яким вводили препарат, отриманий за методом ультразвукової дезінтеграції, кількість лейкоцитів у сироватці крові на 7 день досліду збільшилось на 8,4%, так як

становила $(9,49 \pm 0,21) \cdot 10^6$ /мл порівняно з контрольним значенням $(8,75 \pm 0,35) \cdot 10^6$ /мл. У дослідній групі мишей, яким вводили препарат, отриманий за методом ферментативної дезінтеграції, кількість лейкоцитів у сироватці крові на 7 день дослідження збільшилось на 15,9%, так як становила $(10,14 \pm 0,43) \cdot 10^6$ /мл порівняно з контрольним значенням $(8,75 \pm 0,35) \cdot 10^6$ /мл (рис. 3.3).

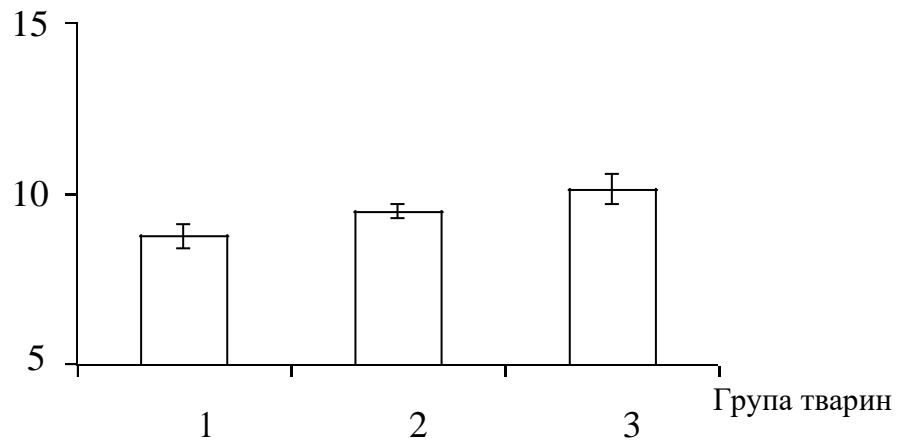


Рис. 3.3 Вплив препаратів із фрагментів клітинних стінок лактобацил на кількість лейкоцитів крові білих мишей

1 – контрольна; 2 – після введення препарату, отриманого методом ультразвукової дезінтеграції; 3 – після введення препарату, отриманого методом ензиматичної дезінтеграції; у варіантах 2 та 3 – $p < 0,05$ відносно контролю.

Щодо кількості лімфоцитів, то у дослідній групі мишей, яким вводили препарат, отриманий за методом ультразвукової дезінтеграції, кількість лімфоцитів у сироватці крові на 7 день дослідження збільшилось на 5,6%, а у дослідній групі мишей, яким вводили препарат, отриманий за методом ферментативної дезінтеграції, – на 10,4% порівняно з контролем (табл. 3.1).

**Вплив препаратів із фрагментів клітинних стінок лактобацил на
кількість лімфоцитів крові білих мишей**

Група тварин	Кількість лімфоцитів, %
Контроль	58,7±2,8
Після введення препарату, отриманого методом ультразвукової дезінтеграції	64,3±1,3*
Після введення препарату, отриманого методом ензиматичної дезінтеграції	69,1±2,1*

Примітка: * – $P < 0,05$ відносно контролю

Окрім загальної кількості лейкоцитів і лімфоцитів визначали лейкоцитарну формулу крові (табл. 3.2).

Із таблиці видно, що суттєвого впливу на лейкоцитарну формулу крові мишей введення обох типів препарату не мало. Так, зовсім не змінилася кількість паличкоядерних нейтрофілів і моноцитів.

Але у той же час спостерігали деяке достовірне підвищення кількості сегментоядерних нейтрофілів. Так, після введення препарату, отриманого за методом ультразвукової дезінтеграції, кількість сегментоядерних нейтрофілів збільшилась на 6,5%, а після введення препарату, отриманого за методом ензиматичної дезінтеграції, – на 4,3%.

Слід звернути увагу на той факт, що після введення препарату, отриманого за методом ультразвукової дезінтеграції, на 7 день дослідження дещо зросла кількість базофілів і еозинофілів, причому в останньому випадку різниця у показниках була достовірною.

Такі результати можуть бути обумовлені тим, що метод ультразвукової дезінтеграції є більш грубим за ензиматичну, і у препараті, окрім фрагментів клітинної стінки могли знаходитися домішки, тобто компоненти і продукти клітин лактобацил, передусім, білкової природи. Підвищення кількості

еозинофілів і базофілів в крові мишей могло бути спричинено розвитком алергічної реакції, так як відомо, еозинофіли та базофіли перші за всі інші клітини крові будуть реагувати на чужорідний білок і його детоксикувати.

Таблиця 3.2

Вплив препаратів із фрагментів клітинних стінок лактобацил на лейкоцитарну формулу крові білих мишей

Показник	Кількість клітин лейкоцитів різних субпопуляцій, %		
	Контрольна група	Дослідна група	
		Після введення препарату, отриманого за методом ультразвукової дезінтеграції	Після введення препарату, отриманого за методом ензиматичної дезінтеграції
Еозинофіли	0,5±0,3	1,80±0,4*	0
Базофіли	0	1,2±0,5	0
Нейтрофіли паличкоядерні	6,6±0,9	6,0±0,6	6,5±0,4
Нейтрофіли сегментоядерні	24,7±2,1	31,2±1,3*	29,0±1,0*
Моноцити	4,0±0,6	3,7±0,9	4,0±0,4

Примітка: * – $P < 0,05$ відносно контролю

Особливо важливим показником оцінки впливу імунологічних препаратів на живі організми є показник НСТ – показник бактерицидної функції фагоцитів, тобто активність фагоцитуючих клітин у присутності антигену. Він є критерієм готовності до завершеного фагоцитозу (табл 3.3).

З таблиці видно, що при введенні препаратів, отриманих методами ультразвукової і ензиматичної дезінтеграцій, активність фагоцитів крові достовірно збільшилась на 3,1 і 3,7% порівняно з контролем.

Таким чином, з отриманих результатів видно, що препарати на основі фрагментів клітинної стінки лактобацил спричиняють збільшення основних імунологічних показників у периферичній крові мишею, причому більш

ефективним є препарат, отриманий за методом ензиматичної дезінтеграції. Але, для отримання таких імуномодулюючих препаратів у промисловому масштабі, цей метод поступається механічному руйнуванню.

Таблиця 3.3

Вплив препаратів із фрагментів клітинних стінок лактобацил на показник НСТ-тесту

Група тварин	Показник НСТ-тесту, %
Контроль	17,8±0,5
Після введення препарату, отриманого методом ультразвукової дезінтеграції	20,9±1,3*
Після введення препарату, отриманого методом ензиматичної дезінтеграції	21,5±1,9*

Примітка: * – $P < 0,05$ відносно контролю

По-перше, ензиматична дезінтеграція є більш придатним методом для руйнування клітинних стінок грамнегативних бактерій. У грамнегативних бактерій пептидоглікан утворює тонку структуру, товщиною близько 2 нм, а у грампозитивних, до яких відоситься і *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*, має значну кількість поперечних зшивок і утворює шар, товщина якого близько 10 нм. Звідси слідує, що клітинні стінки грампозитивних мікроорганізмів мають високу механічну міцність. Її межа складає 10^9 дін/см², що відповідає межі міцності деяких сортів сталі [33]. Тому, для руйнування таких міцних структур універсальними є саме механічні методи дезінтеграції.

По-друге, метод ензиматичної дезінтеграції є більш дорогим, тому для руйнування великої кількості клітин, цей спосіб призведе до значних матеріальних витрат.

ВИСНОВКИ

1. За результатами світлової мікроскопії встановлено, що для отримання імуномодуючого препарату на основі клітинних стінок бактерій *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* оптимальний час ультразвукової і ензиматичної дезінтеграції клітин відповідно становить 20 і 30 хв.
2. При внутрішньочеревному введенні білим лабораторним мишам отриманих препаратів на основі клітинних стінок бактерій *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* за методами ультразвукової і ензиматичної дезінтеграції встановлено достовірне збільшення лейкоцитів периферичної крові відповідно на 8,4 і 15,9%, лімфоцитів – на 5,6 і 10,4%, активності фагоцитів крові – на 3,1 і 3,7% порівняно з контролем.
3. Доведено, що в лабораторних умовах метод ензиматичної дезінтеграції для отримання імуномодуючого препарату на основі клітинних стінок бактерій *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* є більш ефективним за ультразвукову обробку.

ПЕРЕЛІК ПОСИЛАНЬ

1. Бабак О. Я. Сучасна фармакотерапія дисбактеріозу кишечника: Методичні рекомендації / О. Я. Бабак, П. Г. Кушнір. – Харків. – 2020. – 28 с.
2. Бактеріальний вагіноз: сучасний погляд на проблему / Г. Б. Бойко // Український медичний часопис. – 2012. – № 5. – С. 91–93.
3. Вагінальна мікробіота: як відновити баланс при дисбіозі / Л. М. Маланчук, С. Л. Маланчук, Т. А. Небесьо // Здоров'я жінки. – 2016. – № 2. – С. 107–111.
4. Волков М. Ю. Корекція порушень мікробіоценоза людини за допомогою пробіотиків / М.Ю. Волков, А.В. Синиця, Є. А. Ткаченко // Питання харчування. – 2021. – № 4. – С. 32-34.
5. Волькенштейн М.В. Молекулярна біофізика / М.В. Волькенштейн. – К.: Наука, 2005. – 616 с.
6. Глушанова Н. А. Біологічні властивості лактобацил / Н. А. Глушанова // Медицина. – 2022. – № 4. – С. 50-59.
7. Глушанова Н. А. Лактобацили у дослідженні та корекції резидентної мікрофлори людини: Автореф. дис. ... канд. мед. наук., Київ, 2019. – 29 с.
8. Дезінтеграція мікроорганізмів // Матеріали Міжнародної конференції. Збірник. – Харків, 2022. – 324 с.
9. Запруднов А. М. Мікробна флора кишечника та пробіотики / А. М. Запруднов, Л. Н. Мазанкова. – К.: Колос. – 2021. – 204с.
10. Імунобіологічні препарати і перспективи їх використання в інфектології / під ред. Г. Г. Оніщенко, В. А. Альошкіна, С. С. Афанасьєва, В. В. Поспелової. – Одеса: Фенікс, 2018. – 608 с.
11. Імунограма у клінічній практиці / К. А. Лебедєв, І. Д. Понякіна. – К: Наука, 2020. – 224 с.
12. Імуномодельюча дія препаратів еубіотиків / Т. К. Лопатіна, М. С. Блязер, В. Н. Ніколаєнко // Медична практика. – 2017. – Т.3 – С.30-34.

13. Клінічна лабораторна діагностика: методи дослідження / під. ред. проф. І. А. Зупанца. – Х.: «Золоті сторінки», 2018. – 200с.
14. Коваленко Н. К. Біологія молочнокислих бактерій шлунково-кишкового тракта людини і тварин: Автореф. дис. ... д-ра біол. наук. — Київ, 2012. – 29 с.
15. Кривопустов С. П. Сучасні аспекти дисбактеріоза кишечника у дітей та підходи до його корекції / С. П. Кривопустов. – Київ, 2017. – 24 с.
16. Лівінська Є. П. Дезінтеграція лактобацил та ентерококів для отримання фрагментів клітинних стінок / Є. П. Лівінська, Н. К. Коваленко, І. Л. Гармашева // Мікробіологічний журнал. – 2018. – Т.73, №3. – С. 26-32.
17. Мікробіоценоз піхви жінок репродуктивного віку та бактеріальний вагіноз / Короткий огляд бактеріологічних аспектів. Збірник наукових праць співробітників НМАПО. – Київ, 2009. – Вип.17, Кн.1. – С. 921–932.
18. Методи практичної біохімії / під ред. Б. Уільямса. – М.: Мир, 2008. – 716 с.
19. Ніцович І. Р. Особливості перебігу та лікування бактеріального вагінозу у вагітних / І. Р. Ніцович, А. В. Семеняк. – Вищий державний навчальний заклад України «Буковинський державний медичний університет» (Україна, м. Чернівці). – 2016. – Т. VI, № 3 (21). – С. 61–64..
20. Позур В. К. Тейхоєві кислоти бактерій та їхні біологічні властивості / В. К. Позур, Н. В. Сенчило, І. П. Пасічник // Біополімери і клітина. – 2020. – Т.16, №4. – С. 260-269.
21. Показники імунітету при внутрішньочеревному інфікуванні мишей лінії balb/c *Staphylococcus aureus* / В. В. Мокрозуб, Л. П. Бабенко, О. С. Воронкова // Науковий вісник Ужгородського університету. – Серія Біологія, 2016. – Вип. 27. – С. 34-36.
22. Показники імунореактивності організму експериментальних мишей при інтравагінальному навантаженні *Staphylococcus aureus* / Л. П. Бабенко, В.В. Мокрозуб, О. С. Воронкова // Науковий вісник Ужгородського університету. – Серія Біологія. – 2018. – Вип. 27. – С. 24-28.

23. Резніков О. Проблеми етики при проведенні експериментальних медичних і біологічних досліджень на тваринах / О. Резніков // Вісник НАНУ. –2021. – № 1. – С. 5-7.
24. Руководство до практичних занять з мікробіології / під. ред. Н. С. Єгорова – Х.: Фенікс, 2015. – 224 с.
25. Результати застосування вітчизняного синбіотику Біфітен для терапії бактеріальних вагінозів у вагітних / О. В. Цмур, О. Б. Левчук, К. В. Ляшина, Н. В. Бойко // Здоров'я жінки. – 2016. – № 6 (112). – С. 66–72
26. Сучасні методи діагностики вірусних респіраторних інфекцій та їх терапії з використанням препаратів інтерферона (Методичні рекомендації) / під. ред. А. Ф. Модзольського, М. С. Дяченко, М. Я. Співака. – Київ, 2014. – 18 с.
27. Фещенко І. О. Можливості використання пробіотиків при хронічних запальних захворюваннях кишок / І. О. Фещенко, В. М. Хворостінка // Гастроентерологія. – Дніпропетровськ. – 2022. – Вип. 29. – С. 212-215.
28. Фрайфелдер Д. Фізична біохімія / Д. Фрайфелдер. – М.: Мир, 2000. – 582 с.
29. Хавкін А. І. Мікробіоценоз кишечника та імунітет / А. І. Хавкін // Медичний журнал. – 2003. – №3. – С. 17-21.
30. Хаїтов Р. М. Імуномодулятори та деякі аспекти їх клінічного застосування / Р. М. Хаїтов, Б. В. Пінегін // Клінічна медицина. – 2022. – Т. 74, № 8. – С. 7-12.
31. Хаїтов Р. М. Методичні вказівки з дослідження нових імуномодулюючих лікарських засобів / Р. М. Хаїтов, Б. В. Пінегін, Т. В. Латишева // Відомості наукового центру експертизи та державного контролю лікарських засобів. – 2021. – № 1. – С. 11-21.
32. Хаїтов Р. М. Сучасні імуномодулятори: основні принципи їх використання / Р. М. Хаїтов, Б. В. Пінегін // Імунологія. – 2020. – № 5. – С. 4-7.
33. Шапхаєв Е. Г. Дезінтеграція мікробних клітин: посібник / Е. Г. Шапхаєв, В. Ж. Циранов, К. І. Чибуніна. – Ужгород, 2021. – 96 с.

34. Ambrosini V. Chemical composition of the cell wall of lactic acid bacteria and related species / V. Ambrosini, S. Gonzalez, G. Perdigon, A. Holgado // Chem.

- Pharm. Bull. – 2016. – Vol. 44, N 12. – P. 2263-2267.
35. Berg R. D. Probiotics, prebiotics, or conbiotics / R. D. Berg // Trends Microb. – 2017. – Vol. 1. – P. 23-27.
36. Cellular injuries upon exposure of *Escherichia coli* and *Lactobacillus ramnosus* to high-intensity ultrasound / Ananta E. Voigt D. Zenker M. [et al] // J. of Applied Microbiol. – 2018. – Vol. 99. – P. 271-278.
37. Clarke P. R. Physical and chemical aspects of ultrasonic disruption of cells P. R. Clarke, C. R. Hill // J. Acoust. Soc. Am. – 2020. – Vol. 47. – P. 649-653.
38. Hadden J. W. Immunostimulants / J. W. Hadden // Immunol. Today. – 2021. – Vol. 14. – P. 275-280.
39. Immunostimulatory actions of *Lactobacilli*: Mitogenic Induction of Antibody Production and Spleen Cell Proliferation by *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* and *Lactobacillus acidophilus* / J. G. Easo, J. D. Measham, J. Munroe [et al] // Ann. Rev. Microbiol. – 2022. – Vol. 14. – P. 73-83.
40. Isolation and characterization of *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus* from plants in Bulgaria / M. Minkova, S. Kimura, K. Sasaki et al // FEMS Microbiology Letters. – 2017.– Vol. 269.– P. 160-169.
41. Swoboda J. Wall teichoic acid function, biosynthesis and inhibition / J. Swoboda, J. Campbell, J. Timothy // ChemBioChem. – 2020. – Vol. 11. – P. 35-45.