

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ ТЕХНІЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ УКРАЇНИ
“КИЇВСЬКИЙ ПОЛІТЕХНІЧНИЙ ІНСТИТУТ”

ФАКУЛЬТЕТ БІОТЕХНОЛОГІЇ І БІОТЕХНІКИ

КАФЕДРА ПРОМИСЛОВОЇ БІОТЕХНОЛОГІЇ

"На правах рукопису"

УДК 579.261

МАГІСТЕРСЬКА ДИСЕРТАЦІЯ

з спеціальності 8.05140101 – промислова біотехнологія
(код та назва спеціальності)

на тему: Антибактеріальні та імуномодулювальні властивості штаму
Bifidobacterium animalis VKL на експериментальних моделях

Студент групи БТ-31м Степаненко Катерина Іванівна
(шифр групи) (прізвище, ім'я, по батькові)

Науковий керівник: проф. каф. пром. біотехнології, д.б.н., Горчаков В. Ю.
(вчені ступінь та звання, прізвище, ініціали)

Консультанти: д.б.н., проф., чл.-кор. НАНУ Співак М.Я; к.т.н., доц. Орленко А.Т.
(вчені ступінь та звання, прізвище, ініціали)

ВСТУП

Актуальність теми. Створення високоефективних пробіотиків є актуальним завданням сучасної біотехнології, адже сфери застосування цих препаратів значно розширюються, і пробіотична терапія все частіше ставиться на противагу антимікробній, або використовується разом із нею. Основна увага дослідників сконцентрована на пошуку нових пробіотичних штамів мікроорганізмів, вивченні їх антибактеріальної та імуномодулювальної дії, що є основним етапом скринінгу для подальшого створення препаратів комплексної дії.

Тому визначення антагоністичної, адгезивної та імуномодулюючої дії виділеного штаму *Bifidobacterium animalis* VKL є основним підходом на шляху до створення пробіотичного препарату на його основі.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дослідження виконані в рамках науково-дослідної роботи Інституту мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України, у відповідності з тематикою відділу проблем інтерферону та імуномодуляторів, а також у межах Державної теми: «Дослідження ролі інтерферону та інших цитокінів у процесах імунопатогенезу при інфекційних, передпухлинних, нейродегенеративних та інших захворюваннях» за 2013-2017 рр. (державний реєстраційний номер 013U001218).

Мета роботи: визначити вплив штаму *Bifidobacterium animalis* VKL на мікрофлору урогенітального тракту та кишкового вмісту, а також показники імунореактивності організму за умов фізіологічної норми та на моделі експериментальної інтравагінальної стафілококової інфекції шляхом дослідження його антагоністичної та імуномодулювальної дії.

Завдання дослідження: 1) визначити фізіолого-біохімічні, адгезивні та антагоністичні властивості штаму *Bifidobacterium animalis* VKL, а також дослідити його стійкість до антибіотиків різних груп; 2) за фізіологічної норми дослідити вплив пробіотичного штаму на мікрофлору піхви нирок, кишкового вмісту інтактних мишей, а також його імуномодулювальні властивості – вплив на активність клітин фагоцитарної системи, показники клітинного імунітету, продукцію цитокінів Th1/Th2 типу – інтерферонів- α та - γ , інтерлейкінів-4, -12, фактора некрозу пухлин- α ; 3) створити експериментальну модель стафілококової

інфекції уrogenітального тракту та дослідити зміну спектру мікрофлори піхви, нирок та кишкового вмісту в інфікованих мишей, а також показники імунореактивності організму; 4) визначити вплив штаму *Bifidobacterium animalis* VKL на кількісний та якісний склад мікрофлори піхви, кишкового вмісту та нирок за експериментальної інтравагінальної стафілококової інфекції; 5) за експериментальної інтравагінальної стафілококової інфекції дослідити вплив пробіотичного штаму на активність клітин фагоцитарної системи, показники клітинного імунітету, продукцію цитокінів Th1/Th2 типу – інтерферонів- α та - γ , інтерлейкінів-4, -12, фактора некрозу пухлин- α .

Об'єкт дослідження. Штам *Bifidobacterium animalis* VKL

Предмет дослідження. Антибактеріальні та імуномодулювальні властивості штаму *Bifidobacterium animalis* VKL

Наукове та практичне значення основних одержаних результатів.

Встановлено, що основними властивостями штаму *B. animalis* VKL є: висока адгезивність та антагоністична активність, стійкість до різних антибіотиків та імуномодулювальна дія. Пробіотичний штам *B. animalis* VKL за фізіологічної норми збільшував кількість лакто- та біфідобактерій у піхві та кишковому вмісті, а також на розробленій моделі уrogenітальної стафілококової інфекції у мишей прискорював елімінацію *Staphylococcus aureus* 8325-4 із піхви, нирок та кишкового вмісту, нормалізував їх мікрофлору на тлі збільшення кількості лакто- і біфідобактерій. Імуномодулювальна активність *B. animalis* VKL підтверджувалась активацією ефекторних функцій клітин фагоцитарної системи, зміною продукції імунорегуляторних цитокінів, нормалізацією показників клітинного імунітету (кількості CD_4^+ Т-клітин у селезінці та імунорегуляторного індексу CD_4^+/CD_8^+). Разом з тим штам *B. animalis* VKL не впливав на продукцію прозапального цитокіну – фактору некрозу пухлин- α , однак балансував імунну відповідь Th1/Th2-типу.

Штам *B. animalis* VKL рекомендовано для створення пробіотичних препаратів для корекції мікрофлори піхви та кишечника, а також показників імунітету при інфекційно-запальних захворюваннях УГТ.

Апробація результатів дисертації. Основні результати досліджень докладались і обговорювались на наступних конференціях: конференція молодих

учених «Актуальні проблеми біохімії та біотехнології» (Київ, 2015), IX Всеукраїнська науково-практична конференція «Біотехнологія XXI століття» (Київ, 2015), II Міжнародному медико-фармацевтичному конгресі студентів та молодих вчених (Чернівці, 2015), XI Міжнародна наукова конференція студентів і аспірантів «Молодь і поступ біології» (Львів, 2015).

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Для дослідження антибактеріальних та імуномодулювальних властивостей штаму *B. animalis* VKL було використано наступні методи:

- дослідження морфології штаму *B. animalis* VKL здійснювали електронною мікроскопією за загальноприйнятим методом з використання приладу JEM-1400;
- для визначення ферментативної активності використовували біохімічний ряд Гісса, диференційно-діагностичних середовища для виявлення цукролітичної активності;
- адгезивні властивості вивчали на культурі букальних епітеліоцитів за методом Бриліс В.І.;
- для визначення антагоністичної активності штаму *B. animalis* VKL *in vitro* використовували метод перпендикулярних штрихів на агаризованому середовищі;
- чутливість штаму *B. animalis* VKL до дії антибіотиків визначали методом дифузії в агар;
- для визначення спектру мікрофлори та персистенції стафілококу *in vivo* проводили висів аліквот на елективні середовища;
- для дослідження функціональної активності клітин фагоцитарної системи використовували метод інкубації фагоцитів з латексом та НСТ-тест;
- визначення концентрації інтерферону та ФНП- α проводили мікрометодом у культурі перевивних фібробластів мишей;
- дослідження субпопуляційного складу лімфоцитів селезінки проводили за допомогою методу прямої імуофлуоресценції з використанням моноклональних антитіл до CD_3^+ , CD_4^+ , CD_8^+ , CD_{19}^+ антигенів та природних кілерних клітин;

– дослідження продукції інтерлейкіну -4, -12 та інтерферону- γ проводили за допомогою імуноензимного методу дослідження із використанням відповідних імуноензимних тест-систем.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Встановлено, що основними пробіотичними властивостями штаму *B. animalis* VKL є: висока адгезивність до букального епітелію, антагоністична активність відносно широкого спектру умовно патогенної мікрофлори; імуномодулювальні властивості. Даний штам також мав стійкість до різних антибіотиків, що слід враховувати при розробці рекомендацій стосовно схем його сумісного використання з антибіотиками в терапії інфекційно-запальних хвороб. Пробіотичний штам *B. animalis* VKL за фізіологічної норми збільшував кількість лакто- та біфідобактерій у піхві та кишковому вмісті, а також мав антагоністичну дію відносно коліморфних бактерій та грибної флори.

На розробленій моделі уrogenітальної стафілококової інфекції у мишей показано, що пробіотичний штам *B. animalis* VKL при введенні у піхву та/або *per os* прискорював елімінацію *S. aureus* 8325-4 із піхви, нирок та кишкового вмісту, нормалізував їх мікрофлору на тлі збільшення кількості лакто- і біфідобактерій, а також мав імуномодулювальну дію.

Імуномодулювальна активність *B. animalis* VKL за експериментальної уrogenітальної стафілококової інфекції у мишей підтверджувалась активацією ефекторних функцій клітин фагоцитарної системи, зміною продукції імунорегуляторних цитокінів, нормалізацією показників клітинного імунітету (кількості CD_4^+ Т-клітин у селезінці та імунорегуляторного індексу CD_4^+/CD_8^+ у різні терміни спостереження). Під впливом цього пробіотичного штаму продукція прозапального цитокіну фактору некрозу пухлин- α не змінювалась, однак підвищувалась продукція цитокінів Th1-типу – інтерферону- γ та/або інтерлейкіну-12 на тлі зменшення продукції цитокіну Th2-типу – ІЛ-4. Тобто, виявлено здатність *B. animalis* VKL балансувати імунну відповідь Th1/Th2-типу.

Таким чином штам *B. animalis* VKL є перспективним для створення пробіотичних препаратів для профілактики або корекції мікрофлори піхви та

кишечнику, а також нормалізації імунореактивності організму при стафілококової інфекції уrogenітального тракту.

ВИСНОВКИ

1. Встановлено, що штам *Bifidobacterium animalis* VKL володіє: значною біохімічною активністю; антагоністичною дією відносно умовно патогенних мікроорганізмів; високою адгезивністю до клітин букального епітелію, а також стійкістю до різних антибіотиків.

2. З'ясовано, що штам *Bifidobacterium animalis* VKL як за фізіологічної норми так і при стафілококової інфекції впливає на мікрофлору піхви, нирок та кишкового вмісту інтактних тварин, що підтверджується збільшенням кількості лакто- та біфідобактерій у піхві та кишковому вмісті, а також антагоністичною дією відносно коліморфних бактерій, грибної флори та прискоренням елімінації *Staphylococcus aureus* 8325-4.

3. Імуномодулювальна активність штаму *Bifidobacterium animalis* VKL за умов фізіологічної норми та на моделі експериментальної інтравагінальної стафілококової інфекції у мишей підтверджувалась активацією ефektorних функцій клітин фагоцитарної системи, зміною продукції імунорегуляторних цитокінів, нормалізацією показників клітинного імунітету, балансуванням імунної відповіді Th1/Th2-типу на тлі стабільної кількості фактору некрозу пухлин- α .

4. Штам *Bifidobacterium animalis* VKL є перспективним для створення пробіотичних препаратів для профілактики або корекції мікрофлори піхви та кишечнику, а також нормалізації імунореактивності організму при стафілококової інфекції уrogenітального тракту.

Ключові слова: пробіотики, *Bifidobacterium*, антагоністична активність, імуномодулювальна дія, *Staphylococcus*

Публікації: за матеріалами дисертації опубліковано 5 тез доповідей на таких конференціях: конференції-конкурсу молодих учених «Актуальні проблеми біохімії ті біотехнології – 2015»; IX Всеукраїнської науково-практичної конференції «Біотехнологія XXI століття»; XI міжнародній науковій конференції «Молодь і поступ біології» та Всеукраїнському журналі студентів та молодих вчених «Хист».