

УДК 576.852.22:615.45:615.33

К.В. Типлинська, О.В. Советова,
К.С. Позднякова, Н.В. Дехтяренко,
В.Ю. Горчаков

ВИЗНАЧЕННЯ ВПЛИВУ ЦИТОСТАТИКІВ НА ШТАМИ – ПОТЕНЦІЙНІ ПРОДУЦЕНТИ ПРОБІОТИЧНИХ ПРЕПАРАТІВ

Вступ

Нині важливість нормофлори для підтримки здоров'я людини не викликає жодних сумнівів. Симбіотична біоплівка вкриває всі органи, які безпосередньо чи опосередковано контактують з довкіллям, і є важливим бар'єром, який перешкоджає проникненню хвороботворних мікробів у внутрішнє середовище організму. Особливу роль тут відіграє мікрофлора кишечника, яка становить 60 % від загальної кількості мікроорганізмів, що населяють тіло людини [1]. Зміна кількісного і якісного складу нормофлори кишечника може призвести до численних порушень – росту патогенних організмів і розвитку інфекції, порушення травлення і засвоєння поживних речовин, порушення обмінних процесів, пригнічення імунітету та інших розладів [2]. На жаль, сучасні методи лікування часто пригнічують нормофлору організму, що негативно впливає на стан хворого. Зокрема, в значному порушенні мікробних ценозів винна хіміотерапія онкохворих [3–6]. Такі порушення здатні призвести до розвитку ускладнень з боку шлунково-кишкового тракту, пригнічення імунітету та виникнення інфекційних захворювань. Це, в свою чергу, знижує ефективність протипухлинної терапії і може навіть зумовити необхідність її відміни [7]. Тому все частіше після курсів хіміотерапії, а іноді й разом з нею, застосовуються пре- і пробіотики [4, 5]. Однак дія хіміотерапевтичних препаратів як на нормофлору пацієнтів, так і на культури, що входять до складу препаратів, мало вивчена. До того ж, часто вживають необґрунтовано високі дози пробіотиків, що також має негативний вплив на організм хворих [6]. Тому необхідним, на наш погляд, є визначення дії попередньої обробки цитостатиками клітин лактобактерій на їх подальший розвиток і біологічні властивості та відбір перспективних продуцентів пробіотичних препаратів супроводу. Попередніми дослідженнями

нами було визначено принципову можливість росту лактобактерій у середовищі із значними концентраціями цитостатиків, а також відібрано найбільш стійкі до них штами [8–10].

Постановка задачі

Мета статті – визначити вплив попередньої обробки цитостатиками на біологічні властивості культур лактобактерій і встановити стійкість викликаних змін.

Матеріали і методи експериментальних досліджень

Об'єктами досліджень були два штами лактобактерій з музею мікробних культур кафедри промислової біотехнології ФБТ НТУУ “КПІ” (*L. delbrueckii subsp. lactis* LE і *L. rhamnosus* LB3). За тест-культури для визначення спектра антагоністичної активності взято *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Escherichia coli* УКМ В-906 (ATCC 25922), *Pseudomonas fluorescens*, *Staphylococcus aureus* УКМ В 4001 (ATCC 65388), *Candida tropicalis*. Для вивчення впливу цитостатиків було використано найбільш вживані в онкологічній практиці препарати доксорубіцин-КМП (Київмедпрепарат, Україна, Київ), цисплатин “Ебеве”, метотрексат “Ебеве” (Ebewe Pharma, Австрія) та вінбластин-Ріхтер (Gedeon Richter, Угорщина). Культивування молочнокислих бактерій проводилось при 37 °С на рідкому поживному середовищі MRS, а культивування умовно патогенних культур – також при 37 °С на середовищах МПА, МПБ і MRS.

Для визначення можливості росту культур лактобактерій при наявності цитостатиків було використано метод двократних серійних розведень. Середовище MRS розливалось по 4 мл у 10 пробірок. В першу пробірку додавалось 4 мл розчину цитостатику певної концентрації, перемішувалось, після чого 4 мл переносилось у наступну пробірку, і так розведення продовжувалось до передостанньої пробірки, з якої вилучалось потім 4 мл. Остання пробірка слугувала контролем. До кожної пробірки з розведеннями, а також до контрольної пробірки додавалось по 0,4 мл суспензії культур стандарту мутності 0,5 McFarland. Пробірки інкубувались протягом 48 год при температурі 37 °С.

Вплив цитостатиків на ріст і біологічні властивості досліджуваних культур визначався пасивуванням на поживному середовищі MRS

без додавання цитостатиків із визначенням динаміки росту культур вимірюванням оптичної густини на фотоелектрокалориметрі КФК-3 (довжина хвилі 540 нм, кювета 3 мм) і рН.

Наявність стійких генетичних змін визначалась дослідженням біологічних властивостей культур через два роки після обробки. Оброблені культури висівались уколком у напіврідке середовище MRS і вирощувались протягом 48 год при температурі 37 °С, після чого вони поміщались у холодильник при 4 °С. Зберігались культури один місяць, а потім пересівались. Через два роки проводилось дослідження властивостей культур із визначенням динаміки росту їх через вимірювання оптичної густини і рН.

Антагоністична активність штамів лактобактерій визначалась методом дифузії в агар [11]. Цей метод полягає у створенні градієнта концентрацій навколо диска, змоченого культуральною рідиною досліджуваних штамів. Культура вирощувалась протягом 24 год. Далі надосадова рідина зливалась і нею змочувались паперові диски. На чашки з агаризованим середовищем, що найкраще підтримує ріст тестових культур, газом висівались культури. Далі на поверхню чашки накладались диски, змочені культуральною рідиною. Чашки термостатувались протягом 24 год при температурі 37 °С. Потім вимірювався діаметр зони затримки росту навколо диска. Штам-антагоніст вважався високоактивним, якщо зона затримки росту була більшою 20 мм, середньоактивним – від 10 до 20 мм і низькоактивним – меншою 10 мм.

Всі дослідження проводились у чотирьох паралелях. Кожна точка графіків відповідала середньому значенню. Похибка отриманих значень обчислювалась за величиною середнього квадратичного відхилення і коефіцієнта Стьюдента. Обчислення результатів і побудова графічних залежностей виконувались з використанням програми Microsoft Excel [12].

Результати і їх обговорення

Визначення можливості росту культур лактобактерій при наявності цитостатиків. На першому етапі було досліджено вплив попередньої обробки цитостатиками на біологічні властивості культур лактобактерій: накопичення біомаси і зміну рН культур у процесі росту. Для цього відбиралися культури після обробки цитостатиками в найбіль-

шій концентрації препарату, яка не пригнічувала ріст, та в теоретично еквівалентній концентрації (ТЕК). Контролем слугувала необроблена культура лактобактерій. Результати показано на рис. 1–8.

Цисплатин. Визначення можливості росту культур проводилось у концентрації цисплатину 0,355–90,88 мкг/мл (0,125 ТЕК–32 ТЕК). Було виявлено ріст обох культур у всьому досліджуваному діапазоні концентрацій, що свідчить про стійкість культур до цисплатину, причому значних відмінностей у біологічних показниках оброблених і необроблених культур не спостерігалось (рис. 1, 2).

Доксорубіцин. Визначення можливості росту культур у середовищі з доксорубіцином проводилось у діапазоні концентрацій 0,18–45,44 мкг/мл (0,125 ТЕК–32 ТЕК). Штам *L. rhamnosus* LB3 продемонстрував ріст у всьому діапазоні концентрацій. Ріст культури *L. delbrueckii subsp. lactis* LE при концентрації препарату 45,44 мкг/мл не відбувався.

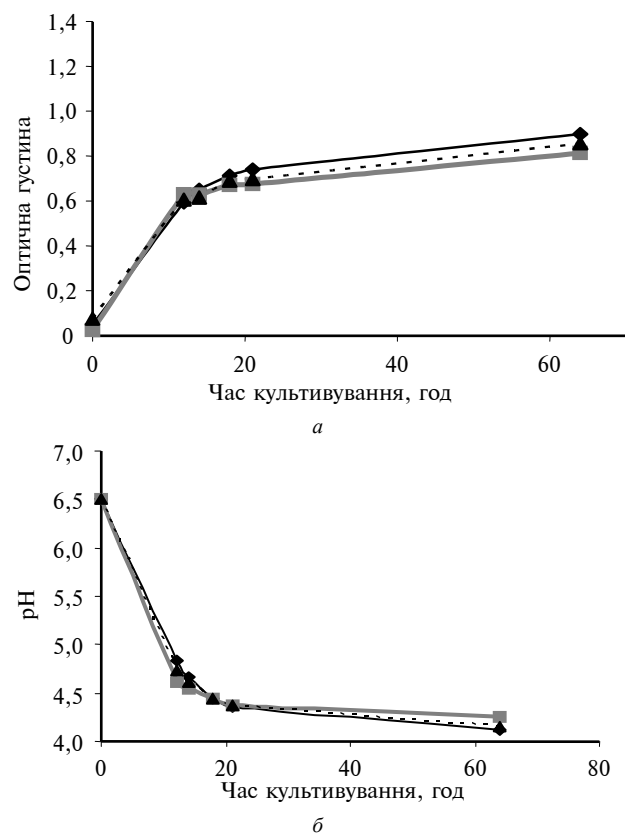


Рис. 1. Динаміка росту культури *L. delbrueckii subsp. lactis* LE після попередньої обробки цисплатином: а – зміна оптичної густини; —◆— – контроль; —■— – 90,88 мкг/мл; ···▲··· – 2,84 мкг/мл; б – зміна рН; —◆— – контроль; —■— – 45,44 мкг/мл; ···▲··· – 2,84 мкг/мл

При обробці штаму *L. delbrueckii subsp. lactis* LE доксорубіцином спостерігалась стимуляція росту культури після обробки препаратом у концентрації 22,72 мкг/мл (рис. 3, а), причому збільшення швидкості росту і кінцевої кількості біомаси відбувалося при незначному збільшенні кислотоутворення (рис. 3, б). Обробка культури доксорубіцином у ТЕК іс-

тотних змін у біологічних показниках культури не викликала.

Культура *L. rhamnosus* LB3 виявила стабільність показників після обробки. Між значеннями біологічних показників росту культур, які піддавалися попередній обробці доксорубіцином, і контрольної (необробленої) культури достовірної різниці не виявлено (рис. 4). Це

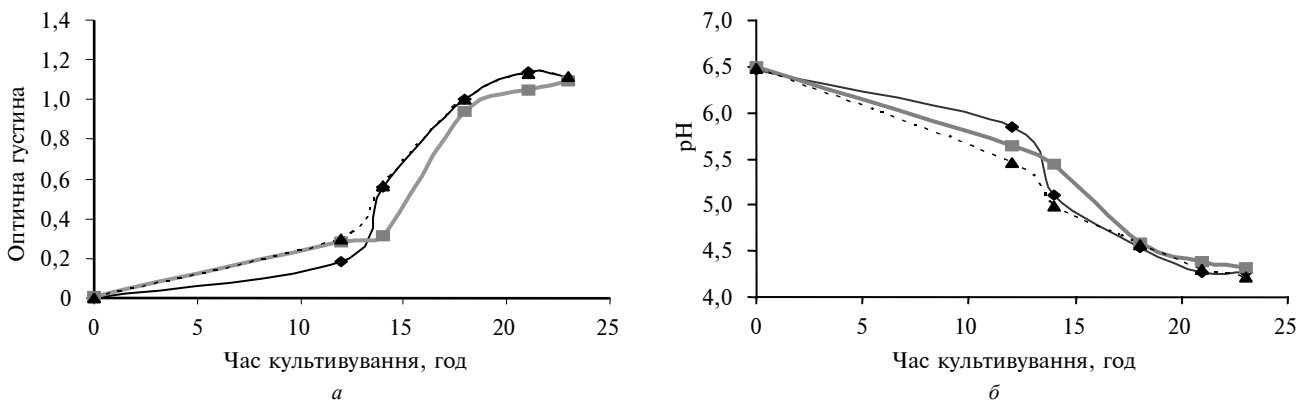


Рис. 2. Біологічні властивості культури *L. rhamnosus* LB3 після попередньої обробки цисплатином: а – зміна оптичної густини; б – зміна рН; —●— – контроль; —■— – 90,88 мкг/мл; - - -▲- - - – 2,84 мкг/мл

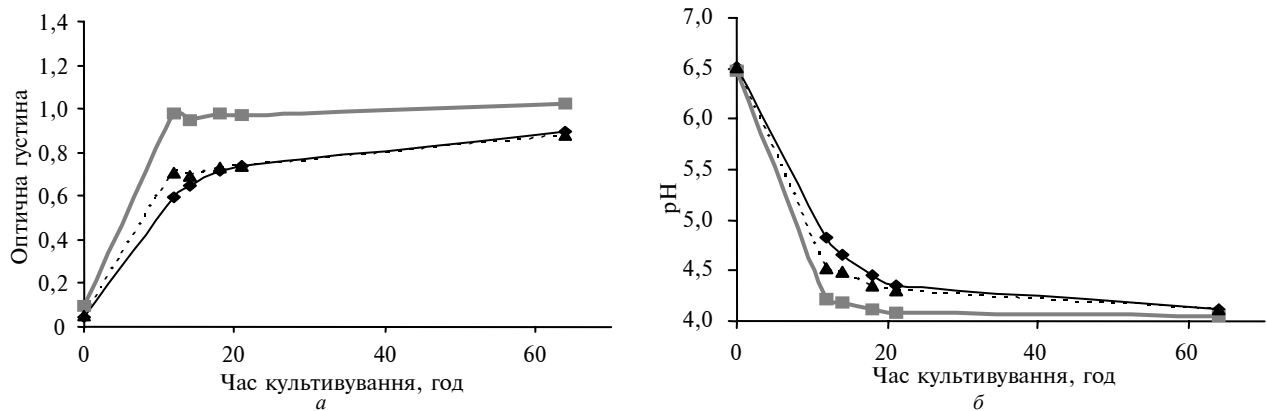


Рис. 3. Динаміка росту культури *L. delbrueckii subsp. lactis* LE після попередньої обробки доксорубіцином: а – зміна оптичної густини; б – зміна рН; —●— – контроль; —■— – 22,72 мкг/мл; - - -▲- - - – 1,42 мкг/мл

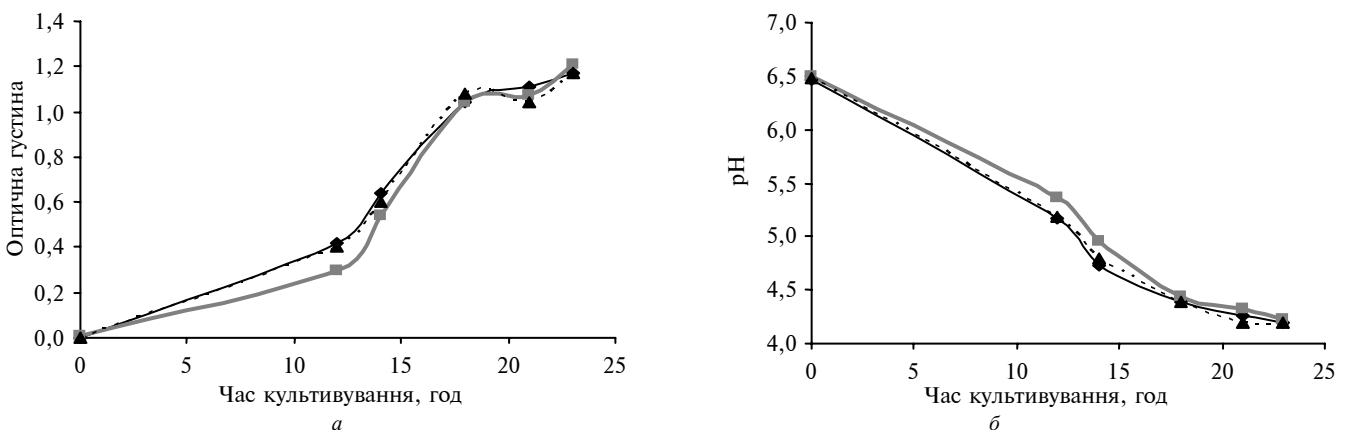


Рис. 4. Біологічні властивості культури *L. rhamnosus* LB3 після попередньої обробки доксорубіцином: а – зміна оптичної густини; б – зміна рН; —●— – контроль; —■— – 45,44 мкг/мл; - - -▲- - - – 1,42 мкг/мл

поряд з високим значенням мінімальної пригнічуючої концентрації (МПК) для культури (понад 45,44 мкг/мл) робить *L. rhamnosus* LB3 перспективним продуцентом при створенні стійких до цитостатиків пробіотичних препаратів.

Метотрексат. Визначення можливості росту культур у метотрексаті проводилось у діапазоні концентрацій 1400–5,47 мкг/мл (0,03 ТЕК–8 ТЕК). При обробці клітин лактобактерій метотрексатом спостерігалась затримка росту всіх культур на 24 год. На 72-у годину ріст культур відбувався в усьому діапазоні досліджуваних концентрацій (таблиця). Це може свідчити про бактеріостатичну дію високих концентрацій препарату. Він здатен призупинити розмноження, але не вбити клітини досліджуваних культур.

Попередня обробка метотрексатом спричиняє значне інгібування росту культури *L. delbrueckii subsp. lactis* LE, причому чим вища була доза препарату, яким оброблялись культури, тим більша затримка росту спостерігалась (рис. 5). Зміни в рості культури і в її кислотоутворенні були пропорційні.

Інгібуючий ефект метотрексату на культу-

ру можна пояснити безпосередньою токсичною дією цитостатику, який накопичується в клітині. Оскільки метотрексат є антиметаболітом (антагоністом фолієвої кислоти), то зв'язуванням з дигідрофолат редуктазою він пригнічує синтез нуклеотидів і білків, що призводить до зупинки росту клітин.

Цікавим є також прискорення росту культури на 18–20-у годину культивування. Це також може опосередковано доводити інгібуючий вплив саме накопиченого всередині клітини препарату. Після посіву культури активного росту не відбувалося, оскільки метотрексат, накопичений в середині клітин, здатен гальмувати розвиток. Далі внаслідок дифузії препарату в середовище чи поділу найбільш стійких мікроорганізмів концентрація метотрексату всередині клітини зменшувалась. Внаслідок цього відновилися реакції відновлення фолієвої кислоти і нормалізувався метаболізм. При накопиченні достатньої кількості клітин, вільних від метотрексату, ріст культури значно прискорювався.

Характер росту культури *L. rhamnosus* LB3 аналогічний такому в *L. delbrueckii subsp. lactis* LE (рис. 6).

Таблиця. Можливість росту культур при обробці різними концентраціями метотрексату

Культура	Година росту	Концентрація препарату, мкг/мл									Контроль
		1400	700	350	175	87,5	43,75	21,87	10,94	5,47	
<i>L. delbrueckii subsp. lactis</i> LE	24	–	–	–	+	+	+	+	+	+	+
	72	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>L. rhamnosus</i> LB3	24	–	–	–	+	+	+	+	+	+	+
	72	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

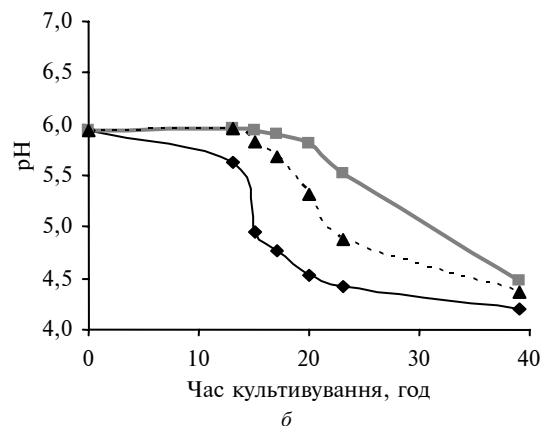
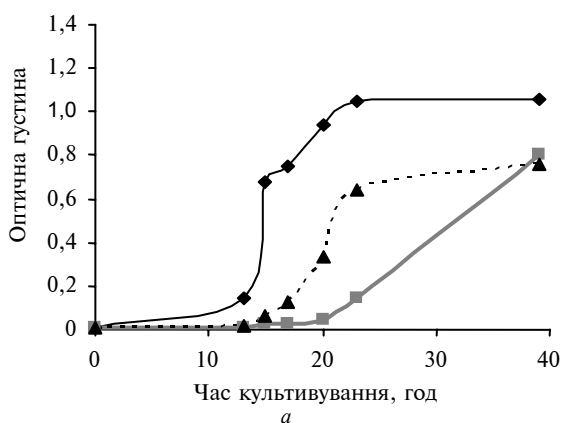


Рис. 5. Біологічні властивості культури *L. delbrueckii subsp. lactis* LE після попередньої обробки метотрексатом: а – зміна оптичної густини; б – зміна pH; —●— — контроль; —■— — 1400 мкг/мл; —▲— — 175 мкг/мл

Вінбластин. Визначення можливості росту культур при додаванні в середовище культивування вінбластину проводилось у діапазоні концентрацій 48,64–0,19 мкг/мл (1 ТЕК–256 ТЕК). У всьому досліджуваному діапазоні концентрацій спостерігався ріст культур. Нечутливість лактобактерій до вінбластину можна пояснити відсутністю в них мішені дії. Оскільки основною мішенню вінбластину є хроматин і веретено поділу, то на клітини прокариотів цей препарат діяти не повинен. Це підтверджує і вивчення біологічних властивостей досліджуваних клітин.

Попередня обробка вінбластином не змінює біологічних властивостей ні *L. delbrueckii subsp. lactis* LE, ні *L. rhamnosus* LB3 (рис. 7, 8), що підтверджує відсутність мішені дії препарату в клітинах лактобактерій.

Визначення антагоністичної активності штамів лактобактерій. Одним з основних критеріїв оцінки пробіотичних штамів є визначення їх антагоністичної активності. Тому на другому етапі досліджень важливим було визна-

чення впливу попередньої обробки цитостатиками саме на здатність культур пригнічувати розвиток патогенної мікрофлори. Дослідження антагоністичних властивостей проводилось методом дифузії в агар.

Штам LE найбільшу активність має проти *B. subtilis* і *E. Coli*, найменшу – проти *Candida tropicalis* (рис. 9). Рівень антагонізму культур після обробки цитостатиками або знижувався (*E. Coli* і *Ps. fluorescens*), або залишався незмінним (*B. subtilis*, *Candida tropicalis*), або навіть підвищувався (*St. aureus*). Це свідчить про те, що, крім неспецифічних антагоністичних факторів (кислоти, перекису), культури синтезують специфічні антибіотикоподібні речовини проти різних груп мікроорганізмів, синтез яких може пригнічуватись чи активізовуватись цитостатиками. Зокрема, знижувалась активність лише проти грамнегативних штамів мікроорганізмів.

Штам LB3 найбільшу активність має проти *E. coli* та *St. Aureus*, найменшу – проти *Candida tropicalis* і *B. subtilis* (див. рис. 9). Рівень антагонізму культур після обробки цитостати-

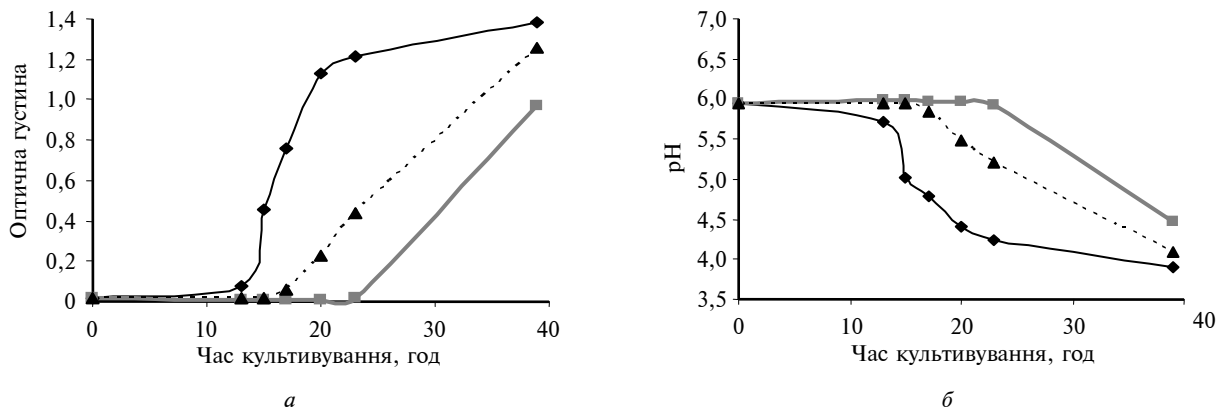


Рис. 6. Біологічні властивості культури *L. rhamnosus* LB3 після попередньої обробки метотрексатом: а – зміна оптичної густини; б – зміна pH; —◆— — контроль; —■— — 1400 мкг/мл; ...▲... — 175 мкг/мл

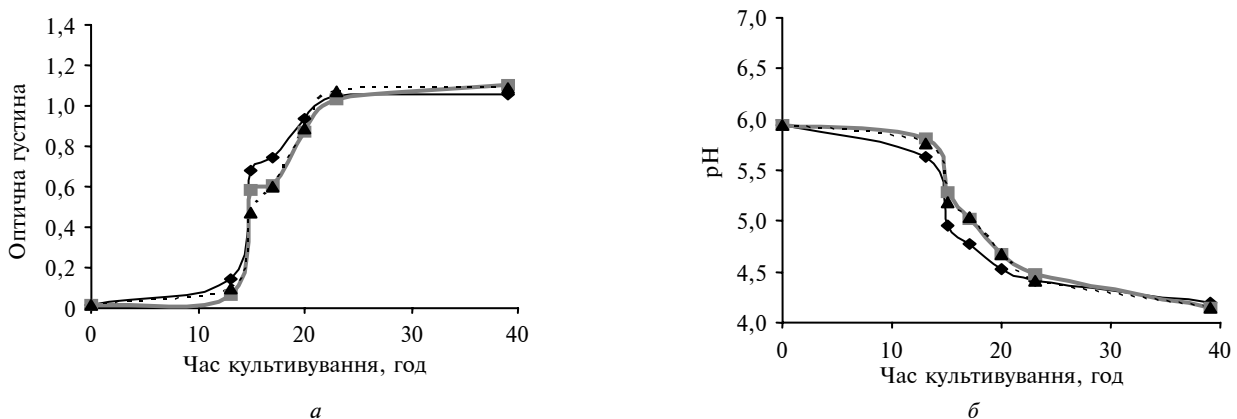


Рис. 7. Біологічні властивості культури *L. delbrueckii subsp. lactis* LE після попередньої обробки вінбластином: а – зміна оптичної густини; б – зміна pH; —◆— — контроль; —■— — 48,64 мкг/мл; ...▲... — 0,19 мкг/мл

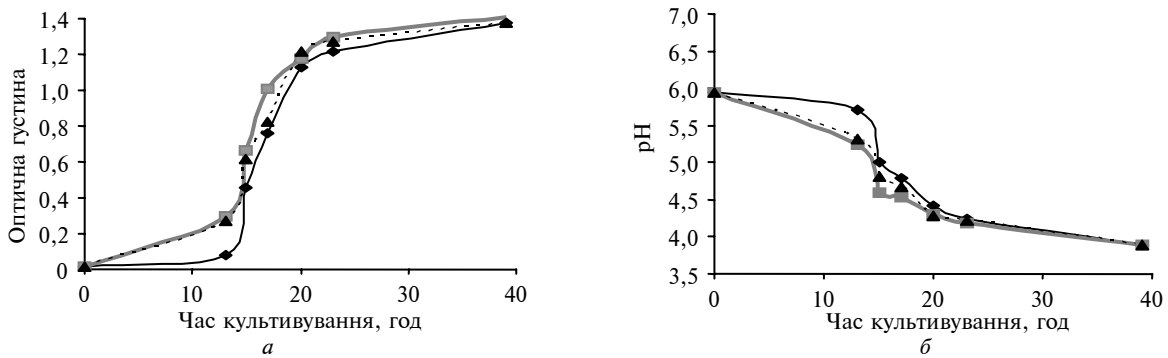


Рис. 8. Біологічні властивості культури *L. rhamnosus* LB3 після попередньої обробки вінбластином: *a* – зміна оптичної густини; *б* – зміна рН; —●— – контроль; —■— – 48,64 мкг/мл; ...▲... – 0,19 мкг/мл

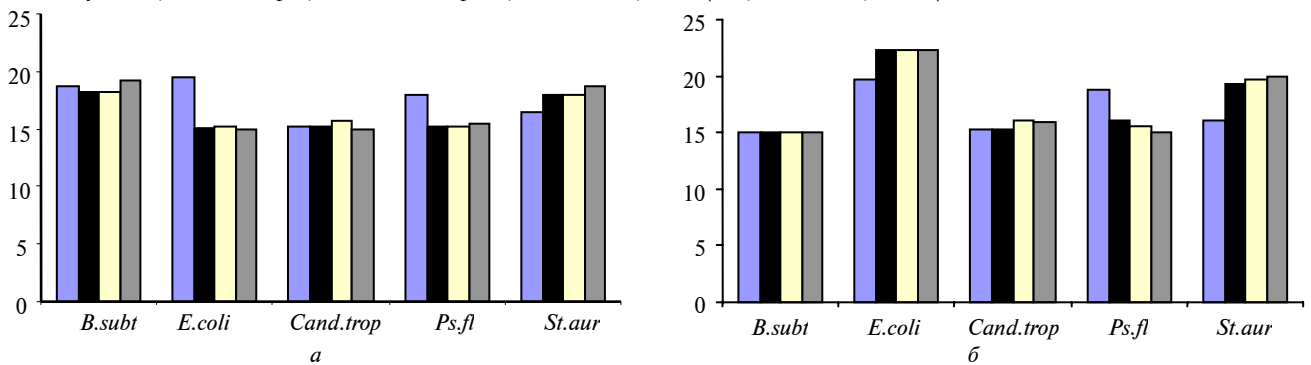


Рис. 9. Антагоністичні властивості досліджуваних культур: *a* – *L. delbrueckii subsp. lactis* LE; *б* – *L. rhamnosus* LB3; ■ – контроль; попередня обробка: ■ – доксорубіцином; □ – метотрексатом; ▣ – цисплатином

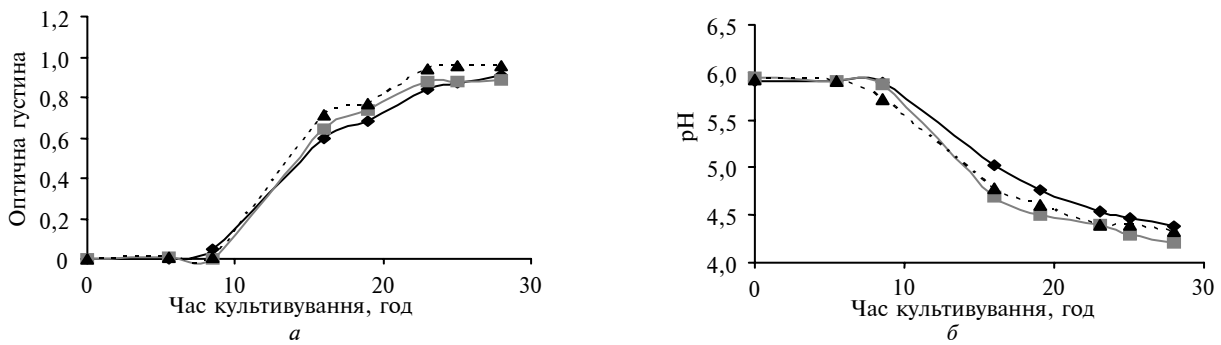


Рис. 10. Біологічні властивості культури *L. delbrueckii subsp. lactis* LE через два роки після попередньої обробки цитостатиками: *a* – зміна оптичної густини; *б* – зміна рН; —●— – контроль; —■— – 45,44 мкг/мл; ...▲... – 1400 мкг/мл

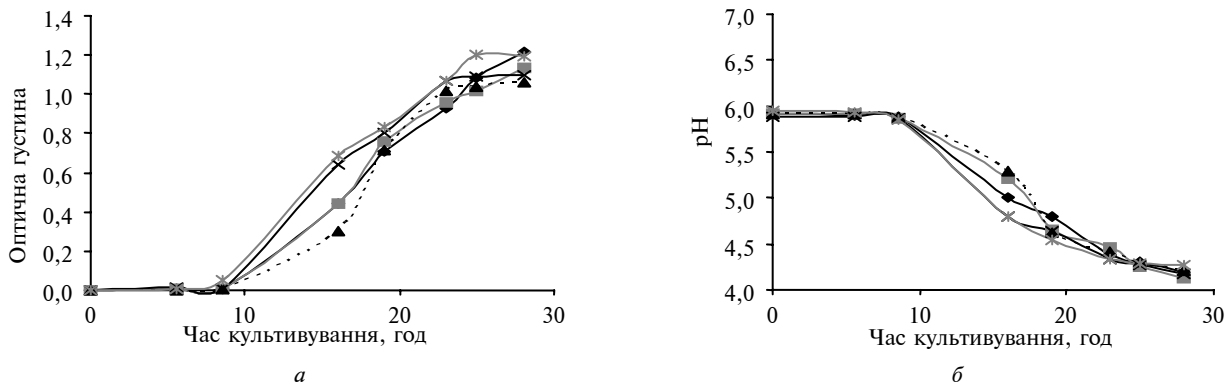


Рис. 11. Біологічні властивості культури *L. rhamnosus* LB3 через два роки після попередньої обробки цитостатиками: *a* – зміна оптичної густини; *б* – зміна рН; —●— – контроль; —■— – 45,44 мкг/мл; ...▲... – 90,88 мкг/мл; —×— – 1400 мкг/мл; —*— – 48,64

ками або знижувався (*Ps. fluorescens*), або залишався незмінним (*B. subtilis*, *Candida tropicales*), або навіть підвищувався (*St. aureus*, *E. coli*).

Визначення стійкості змін, що виникли в культурах лактобактерій під дією цитостатиків. Оскільки всі цитостатики проявляють мутагенні властивості, то доцільним є дослідження стійкості змін, що виникають під їх дією. Для цього проводилось визначення параметрів росту досліджуваних штамів через два роки після обробки.

Обидві досліджувані культури не виявили відмінностей у біологічних властивостях порівняно з контролем (рис. 10, 11), тобто можна зробити висновок, що в культур не виникає жодних стійких мутацій. Якщо препарати і мають мутагенний вплив на досліджувані штами, то мутації, що виникли, швидко репаруються і не мають ніякого негативного впливу на подальший розвиток культур.

Вивчення антагоністичних властивостей культур через два роки після попередньої обробки також показало відсутність істотних відмінностей у пригніченні росту культур. Отже,

можна дійти висновку, що всі метаболічні порушення, викликані обробкою цитостатиками, швидко ліквідуються репараційною системою лактобактерій.

Висновки

Встановлено, що досліджувані культури здатні рости в середовищах, які містять значні концентрації цитостатиків.

Вплив цитостатиків на досліджувані культури специфічний і залежить як від штаму, так і від препарату. Найбільш токсичним виявився метотрексат, найменш токсичним – цисплатин.

Через два роки після обробки цитостатиками значних відмінностей між обробленими і контрольними культурами не виявлено. Це свідчить про відсутність стійких змін, які могли б виникнути під мутагенним впливом цитостатиків.

Досліджувані штами мають високу стійкість до цитостатичних препаратів і можуть бути використанні при створенні пробіотиків для супроводжувальної терапії онкохворих.

Е.В. Типлинская, О.В. Советова,
Е.С. Позднякова, Н.В. Дехтяренко, В.Ю. Горчаков

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВЛИЯНИЯ ЦИТОСТАТИКОВ НА ШТАММЫ – ПОТЕНЦИАЛЬНЫЕ ПРОДУЦЕНТЫ ПРОБИОТИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ

Химиотерапия онкобольных приводит к разрушению эпителия кишечника и, как следствие, к нарушению нормофлоры. Коррекция нормофлоры во время химиотерапии позволит улучшить состояние больных и уменьшит токсичное влияние химиопрепаратов на организм. Нами было рассмотрено влияние наиболее употребляемых цитостатиков на культуры молочнокислых бактерий. Показано, что исследуемые штаммы устойчивы к действию высоких концентраций химиопрепаратов. К тому же, цитостатики не имеют на них мутагенного влияния.

K.V. Typlyns`ka, O.V. Sovetova, K.S. Pozdnyakova,
N.V. Dehtyarenko, V.Yu. Gorchakov

ON DETERMINING THE EFFECT OF CYTOSTATICS ON STRAINS – POTENTIAL PRODUCERS OF PROBIOTIC PREPARATIONS

The paper highlights that chemotherapy leads to the destruction of the bowel epithelium and breach microflora. We suggest that the correction of microflora during chemotherapy allows improving the condition of the patients and reduces the toxic effect of drugs on the body. We study the influence of the frequently used cytostatics on the strains of lactic bacteria. The research results show that the strains under study are resistant to high concentrations of drugs and cytostatics do not have mutagenic effects on these cultures.

1. Янковский Д.С. Состав и функции микробиоценозов различных биотопов человека // Здоровье женщины. – 2003. – № 4(16). – С. 145–158.
2. Григорьев П.Я., Яковенко Э.П. Нарушение нормального состава кишечного биоценоза и методы его коррекции // Русский мед. журн. – 2004. – 6, № 2. – С. 27–31.
3. Гуніна Л.М., Кабан О.П., Литвиненко О.О. Ендогенна інтоксикація при виникненні та лікуванні злоякісних пухлин // Медичний Всесвіт – 2001. – 1, № 1. – С. 25–31.
4. Максимов И.К., Ардатская М.Д. Нарушения микробиоценоза на фоне полихимиотерапии у больных

- опухолевыми заболеваниями системы крови: новые методы диагностики и коррекции // Гастроэнтерология. – 2004. – № 13(90). – С. 16–21.
5. Максимов И.К., Калинин А.В., Рукавицын О.А. и др. Состояние микрофлоры кишечника у больных опухолевыми заболеваниями системы крови при полихимиотерапии // Клиническая медицина. – 2005. – № 2. – С. 48–53.
 6. Шевела Д., Дмитриева Н.В., Петухова И.Н. и др. Инфекции желудочно-кишечного тракта у онкологических больных: современные подходы к лечению // Акт. вопр. клинической онкологии. – 2003. – 5, № 3. – С. 32–35.
 7. Ушкалова Е.А. Менеджмент желудочно-кишечных побочных реакций, индуцированных противоопухолевыми средствами // Фарматека. – 2006. – № 12(127). – С. 38–42.
 8. Дехтяренко Н.В., Позднякова К.С., Советова О.В. та ін. Відбір штамів пробіотичних культур молочнокислих бактерій для створення препаратів супроводу при проведенні хіміотерапії та оцінка дії на них цитостатичних препаратів // Тези доп. VII Міжнар. конф. молодих онкологів “Сучасні проблеми експериментальної і клінічної онкології”, м. Київ, 2-3 лютого 2006 р. – К., 2006.
 9. Советова О.В., Типлинська К.В., Дехтяренко Н.В., Горчаков В.Ю. Стійкість лактобактерій до цитостатиків як критерій відбору пробіотичних штамів для створення препаратів супроводу хіміотерапії // Тези доп. VIII конф. молодих онкологів з міжнародною участю “Сучасні проблеми експериментальної і клінічної онкології”, м. Київ, 26–27 квітня 2007 р. – К., 2007.
 10. Дехтяренко Н.В., Позднякова К.С., Советова О.В. та ін. Визначення впливу хімотерапевтичних препаратів на клітини культур мікроорганізмів – претендентів для створення пробіотиків // Тези доп. конф. молодих учених “Актуальні проблеми біохімії та біотехнології–2006”, м. Київ, 6-7 червня 2006 р. – К., 2006.
 11. Егоров Н.С. Основы учения об антибиотиках. – М.: Высш. шк., 1979. – с. 238-239.
 12. Лапач С.Н., Чубенко А.В., Бабич П.Н. Статистика в науке и бизнесе. – К.: МОРИОН, 2002. – 640 с.

Рекомендована Радою
факультету біотехнології і біотехніки
НТУУ “КПІ”

Надійшла до редакції
14 квітня 2009 року