ЖИТТЕЗДАТНІСТЬ ТА АДГЕЗІЯ ДО ЕРИТРОЦИТІВ ЛЮДИНИ ПРОБІОТИЧНИХ ШТАМІВ МІКРООРГАНІЗМІВ ПІСЛЯ ІММОБІЛІЗАЦІЇ В АЛЬГІНАТНОМУ ГЕЛІ І ЗБЕРІГАННЯ ЗА РІЗНИХ НИЗЬКИХ ТЕМПЕРАТУР

Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, Харків

Дослідження присвячене розробці технологій довгострокового зберігання іммобілізованих в гелевих носіях пробіотиків при різних низьких температурах. Мета дослідження – вивчити збереженість та адгезивну активність мікроорганізмів-пробіотиків після іммобілізації в альгінатному гелі і зберігання за різних низьких температур протягом 24 місяців (термін спостереження). Об'єкти і методи дослідження. Пробіотичні штами мікроорганізмів *Escherichia coli* M-17 (*E. coli* M-17), *Lactobacillus acidophilus* IMB B-2637 (*L. acidophilus*), *Saccharomyces cerevisiae* IMB Y-505 (*S. cerevisiae*) були іммобілізовані в 1%-му альгінатному гелі без добавок або з додаванням лактози, сахарози, знежиреного молока та захисного сахарозо-молочно-лактозного середовища. Зразки заморожували із неконтрольованими швидкостями охолодження в холодильних камерах з температурами -20 , -40 , -75 °C. Під час заморожування до -196 °C зразки охолоджували до -40 °C зі швидкістю 1 град. / хв., а потім занурювали у рідкий азот. Зразки зберігали при вказаних температурах протягом 24 місяців (термін спостереження). В процесі зберігання частину гранул відігрівали на водяній бані і розчиняли у 4%-му ЕДТА. Життєздатність мікроорганізмів визначали за здатністю мікробних клітин утворювати колонії на агаризованих середовищах. Адгезивну активність визначали за здатністю мікроорганізмів адгезувати до еритроцитів людини 0(I) групи, Rh(+). Отримані результати та обговорення. На етапі охолодження до -20 , -40 , -75 , -196 °C та після наступного зберігання при -196 °C іммобілізовані мікроорганізми в усіх видах гелю не гинули. При -20 , -40 , -75 °C в більшості зразків загибель клітин починалася між 1-им та 3-им місяцями зберігання. Через 24 місяці було встановлено, що найбільш стійкими до зберігання за цих температур були бактерії *L. acidophilus*, а найбільш чутливими – дріжджі *S. cerevisiae*. Показники життєздатності усіх мікроорганізмів, іммобілізованих у 1%-му гелі без добавок, були мінімальними. Додавання до складу альгінатного гелю дисахаридів лактози, сахарози, сахарозо-молочно-лактозного середовища середовища та молока підвищувало кріопротективні властивості альгінатного гелю. Найбільш високу життєздатність іммобілізованих мікроорганізмів спостерігали у гелі з додаванням сахарозо-молочно-лактозного середовища середовища. Зі зниженням температури зберігання від -20 до -75 °C кількість життєздатних мікробних клітин в усіх зразках гелю підвищувалася. Іммобілізація в гелевих носіях та зберігання протягом 24 місяців не впливали на адгезивні властивості пробіотиків *E. coli* M-17, *L. acidophilus*, *S. cerevisiae*. Зміни показників життєздатності мікробних клітин пов'язані з вираженістю пошкоджуючих фізико-хімічних факторів, які супроводжують процеси кристалізації води при температурах -20 , -40 , -75 °C. Аналізується захисна дія добавок до складу альгінатного гелю. Висновки. Під час довгострокового зберігання за різних низьких температур на життєздатність іммобілізованих в гелевих гранулах мікроорганізмів впливають видова кріорезистентність мікроорганізмів, температурні режими і терміни зберігання, склад гелевого носія. Процеси іммобілізації та зберігання за низьких температур не змінювали адгезивну активність іммобілізованих мікроорганізмів.

Ключові слова: пробіотики, іммобілізація, альгінатний гель, низькотемпературне зберігання.

Зв'язок публікації з плановими науково-дослідними роботами. Дане дослідження є частиною відомчої (НАН України) науково-дослідної роботи «Вивчення механізмів кріопошкодження мікроорганізмів, іммобілізованих в гелевих носіях з різними фізико-хімічними властивостями, під час низькотемпературного зберігання та ліофілізації», № державної реєстрації 0118U001187.

Вступ

Мікробіом людини та тварин відіграє суттєву роль у підтриманні або відновленні імунних, біохімічних і метаболічних ланцюгів гомеостазу [1, 2, 3].

В останні десятиліття серед населення різних регіонів Землі та сільськогосподарських тварин значно поширилися дисбіотичні стани шлунково-кишкового тракту (ШКТ), що пов'язано із неконтрольованим зростанням кількості пошкоджуючих екзогенних і ендогенних факторів [2, 4].

Для лікування і профілактики дисбіотичних станів, відновлення і регуляції мікробіому застосовують пробіотичні препарати, які на сьогодні поділяють на п'ять груп: пробіотики, пребіотики, симбіотики, метабіотики, пробіотичні біологічно

активні добавки [5]. Серед цих препаратів найбільшого поширення набули пробіотики і симбіотики, до складу яких входять живі пробіотичні штами мікроорганізмів.

За сучасними вимогами до пробіотичних препаратів мікроорганізми-пробіотики повинні бути фено- і генотипово класифікованими, апатогенними, життєздатними, здатними до адгезії до кишкового епітелію і до колонізації кишечника, бути абсолютно безпечними для організму людини або тварин [6, 7, 8].

Відповідно, комерційні фармакологічні та ветеринарні пробіотичні препарати, лікувально-профілактичні продукти харчування, кормові добавки, які містять мікроорганізми-пробіотики, повинні забезпечувати збереженість життєздатно-

сті і біологічних властивостей пробіотиків під час зберігання до реалізації та захищати мікробні клітини від пошкоджуючої дії фізико-хімічних факторів захисних бар'єрів ШКТ. Все більше уваги дослідники і біотехнологи приділяють розробці препаратів пробіотиків, іммобілізованих в носіях із полісахаридних гелів [9, 10]. Такі препарати мають низку переваг над класичними формами (саше, капсули, пігулки, ліофілізована маса та ін.) [2, 11, 12].

Зберігають пробіотичні препарати, продукти і добавки в умовах гіпотермії, за різних низьких температур та в ліофілізованому стані [13, 14]. Технології зберігання пробіотиків, іммобілізованих в гелевих носіях, знаходяться в стані розробки.

Мета дослідження

вивчити збереженість та адгезивну активність мікроорганізмів-пробіотиків після іммобілізації в альгінатному гелі і зберігання за різних низьких температур протягом 24 місяців (термін спостереження).

Об'єкти і методи дослідження

Об'єктами дослідження були пробіотичні штами мікроорганізмів *Escherichia coli* M-17 (далі *E. coli* M-17), *Lactobacillus acidophilus* IMB B-2637 (далі *L. acidophilus*), *Saccharomyces cerevisiae* IMB Y-5051 (далі *S. cerevisiae*). Штам *E. coli* M-17 був отриманий із Всеросійської колекції промислових мікроорганізмів НДЦ «Курчатовський інститут» – «ГосНИИгенетика» (Москва, РФ), *L. acidophilus* та *S. cerevisiae* – із Депозитарію мікроорганізмів Інституту мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України (Київ, Україна).

E. coli M-17 вирощували на скошеному агаризованому середовищі «Nutrient Agar» («Biolife», Італія) протягом 24 год. при 37 °C, *L. acidophilus* – на середовищі MRS («HiMedia», Індія) протягом 48 год. при 37 °C, *S. cerevisiae* – на сусло-агарі із вмістом цукру за Балінгом 8 ° [15] протягом 48 год. при 30 °C.

Для основи гелевих гранул використовували альгінат натрію «Alginic acid sodium salt» («Sigma-Aldrich», Німеччина). Модифікацію складу альгінатного гелю проводили додаванням до його складу лактози («Альпавіт», Німеччина), сахарози («Sudzucker», Німеччина), середовища СМЛ [16], молока (молоко 1,5% ультрапастеризоване «Селянське», ДСТУ 2661:2010, ТОВ «Люстдорф», Україна).

Вихідні розчини 2%-го альгінату натрію з додаванням вказаних компонентів стерилізували методом тіндалізації [17]. Перед іммобілізацією мікробні клітини змивали з поверхні скошених агаризованих середовищ, відмивали від залишків середовищ і суспендували у дистильованій воді. Мікробні суспензії змішували у співвідношенні 1:1 з 2%-ним розчином альгінату натрію зі вказаними вище добавками або без них. Гелеві гранули з іммобілізованими клітинами формува-

ли методом іонотропного гелеутворення [18]. Стабілізували гранули у 0,2М розчині CaCl_2 протягом 20 хвилин при 37 °C. Потім гранули промивали дистильованою водою, підсушували і вносили по 100 гранул в кріопробірки об'ємом 5,0 мл («Nunc», США).

В дослідженні були використані наступні 5 видів альгінатного гелю:

№1: 1% альгінатний гель без добавок;

№2: 1% альгінатний гель + 10% лактози;

№3: 1% альгінатний гель + 10% сахарози;

№4: 1% альгінатний гель + середовище СМЛ (кінцева концентрація лактози – 1%, сахарози – 5%, молока – 5% (v/v));

№5: 1% альгінатний гель + 5% молока (v/v).

Кінцева концентрація мікробних клітин в гелях становила 10^9 кл / мл.

До температур –20, –40, –75 °C зразки заморожували з неконтрольованими швидкостями охолодження на полицях морозильних камер. Під час заморожування до –196 °C зразки охолоджували до –40 °C у програмному заморожуванні біоб'єктів «Cryoson» (Німеччина) зі швидкістю 1 град. / хв., а потім занурювали у рідкий азот. Зразки зберігали за вказаних температур протягом 24 місяців. Для зберігання зразків використовували побутові холодильні камери «Nord» (Україна) (–20±3,0 °C), «UGUR» (Туреччина) (–40±2,0 °C), «JOUAN» (Франція) (–75±1,5 °C). Для зберігання зразків у рідкому азоті використовували низькотемпературне сховище біоб'єктів ХБ-0,5 (РФ). Через 24 год. та 1, 3, 6, 12, 24 місяців відбирали частину зразків і відігрівали їх на водяній бані при 30 °C. Гелеві гранули розчиняли у 4%-му ЕДТА («BASF», Німеччина), мікробні клітини тричі відмивали фізіологічним розчином. Після відмивання визначали життєздатність і адгезивну активність клітин до еритроцитів людини. За контролі були показники життєздатності і адгезивної активності мікроорганізмів до та після зберігання за низьких температур протягом 24 год.

Життєздатність мікробних клітин визначали «чашковим методом» Коха за здатністю клітин до колонієутворення на агаризованих середовищах [19].

Збереженість поверхневих адгезивних структур пробіотиків вивчали фотометричним методом визначення бактеріофіксуючої здатності еритроцитів [20]. Після розчинення гелевих гранул і процедури відмивання готували суспензії клітин пробіотиків у фізіологічному розчині із концентрацією 10^9 кл / мл. В експериментах використовували суспензії відмитих формалінізованих еритроцитів людини 0 (I) групи Rh (+) [21]. Концентрація еритроцитів складала 10^8 кл / мл. В силіконізовані пробірки вносили по 2,5 мл мікробних суспензій та 1,0 мл суспензії еритроцитів. За контроль були пробірки з мікробними суспензіями, в які замість еритроцитів вносили фізіологічний розчин. Пробірки струшували протягом 30 хв. за температури 37 °C та 50 обертів

платформи за хвилину в термостатованій установці для вирощування мікроорганізмів «УВМТ – 12 – 250» (НПО «Типко – Элион», РФ). Потім пробірки центрифугували при 1000 об./хв. протягом 2 хв. для осадження еритроцитів, відбирали надосад і визначали його оптичну щільність з використанням 96-лункового планшету «TPP» (Швейцарія) та мікропланшетного аналізатора «Lisa Scan EM» («Erba Lachema s.r.o.», Чехія). Мікробіофіксуючу активність еритроцитів (МФАЕ), тобто характеристику фіксації мікроорганізмів на еритроцитах, оцінювали за формулою та шкалою, також запропонованими в роботі [20].

Під час статистичної обробки експериментальних даних обчислювали їх середнє арифметичне ($\bar{m}$) і стандартне відхилення M . Результати подавали у вигляді $\bar{m} \pm M$ [22]. Для визначення статистичної достовірності відсутності або наявності відмінностей у двох різних наборах отриманих числових характеристик використовували t -критерій Ст'юдента: якщо обчислене значення критерію перевищувало критичне (табличне) значення на рівні значущості $p < 0,05$, то відмінності, що спостерігалися, вважали статистично достовірними на відповідному рівні ($p < 0,05$). Статистичну обробку отриманих даних проводили за допомогою пакету програм MS Excel, а також програми «Statistica 6.0».

Результати дослідження та їх обговорення

Було встановлено, що всі іммобілізовані клітини після охолодження за вказаними умовами до температур -20 , -40 , -75 , -196 °C не гинули. Після наступного зберігання протягом 24 міс при температурі -196 °C життєздатність клітин у всіх

зразках також достовірно не змінювалася.

Бактерії *L. acidophilus*, іммобілізовані в гелі №1, починали гинути при температурах -20 , -40 °C з першого місяця зберігання. Кількість життєздатних клітин в цих зразках через 1 місяць становила 68,2 та 71,5 %, відповідно. Достовірне зниження показників життєздатності у всіх інших зразках починало відбуватися між третім та шостим місяцями зберігання. Через 24 місяці зберігання при температурах -20 , -40 , -75 °C показники життєздатності бактерій *L. acidophilus*, іммобілізованих в гелі №1, складали 17,4; 29,3; 63,3%, відповідно (рис. 1). Показники в гелі №2 – 38,0; 39,8; 73,1%, відповідно. Показники в гелі №3 – 32,0; 44,3; 72,0%, відповідно. Показники в гелі №4 – 49,6; 52,2; 79,0%, відповідно, а в гелі №5 – 41,5; 41,5; 68,2%, відповідно.

Бактерії *E. coli* M-17, іммобілізовані в гелі №1, починали гинути при -20 °C на першому місяці зберігання, при -40 °C – між першим та третім місяцями. Кількість життєздатних клітин в цих зразках знизилася до 63,9 та 69,1 %, відповідно. У всіх інших зразках при температурах -20 , -40 , -75 °C показники життєздатності почали знижуватися між третім та шостим місяцями зберігання. Через 24 місяці зберігання при температурах -20 , -40 , -75 °C показники життєздатності бактерій *E. coli* M-17, іммобілізованих в гелі №1, складали 11,2; 28,6; 60,2%, відповідно (рис. 2). Показники в гелі №2 – 26,7; 35,4; 66,1% і в гелі №3 – 28,9; 38,6; 64,8%. Показники в гелі №4 – 36,9; 45,2; 80,5%, а в гелі №5 – 29,5; 37,1; 70,1%.

Рис. 1. Життєздатність бактерій *E. coli* M-17, іммобілізованих в носіях з альгінатного гелю, після зберігання протягом 24 місяців за температур -20 , -40 , -75 і -196 °C. Усі відмінності достовірні ($p < 0,05$), окрім відмінностей між показниками життєздатності клітин, що зберігалися при -196 °C протягом 12 і 24 місяців.

Рис. 2. Життєздатність бактерій *L. acidophilus*, іммобілізованих в носіях з альгінатного гелю, після зберігання протягом 24 місяців за температур -20 , -40 , -75 і -196 °C. Усі відмінності достовірні ($p < 0,05$), окрім відмінностей між показниками життєздатності клітин, що зберігалися при -196 °C протягом 12 і 24 місяців.

Дріжджі *S. cerevisiae*, іммобілізовані в гелях №№1–3, починали гинути при температурах -20 , -40 , -75 °C на першому місяці зберігання, іммобілізовані в гелях №№4–5 – між третім та шостим місяцями. Через 24 місяці зберігання при температурах -20 , -40 , -75 °C показники життєздатності дріжджів *S. cerevisiae*, іммобілізованих в гелі №1, складала 6,0; 14,0; 34,7%, відповідно (рис. 3). Показники життєздатності в гелі №2 – 18,9; 21,9; 52,5% і в гелі №3 – 19,5; 32,1; 54,8%. Показники в гелі №4 – 36,1; 50,3; 62,3 % і в гелі №5 – 25,3; 41,3; 58,3%.

В експериментах з вивчення адгезивної активності пробіотиків по відношенню до еритроцитів було встановлено видові відмінності адгезивного потенціалу штамів мікроорганізмів, які були об'єктами дослідження. Згідно шкали оцінки [20], МФАЕ для цих мікроорганізмів була високою (*E. coli* M–17) (рис. 4) та середньою (*L. acidophilus*, *S. cerevisiae*) (рис. 5, 6). До іммобілізації та до зберігання за низьких температур МФАЕ для *E. coli* M–17 становила $40,0 \pm 3$.

Процеси іммобілізації в різних варіантах альгінатного гелю (1%-ний гель альгінату без добавок та з додаванням до його складу лактози, сахарози, середовища СМЛ та молока), охолодження до температур -20 , -40 , -75 , -196 °C та зберігання за цих температур протягом 24 місяців не впливали на здатність та вираженість адгезивної активності *E. coli* M–17, *L. acidophilus*, *S. cerevisiae* (рис. 4–6).

Отримані результати свідчать про те, що в процесі довгострокового зберігання за різних ни-

зких температур на життєздатність іммобілізованих в гелевих гранулах пробіотиків впливають видова кріорезистентність мікроорганізмів, температурні режими і терміни зберігання, склад гелевого носія. Є ще один фактор, який в більшості досліджень в галузі кріобіології впливає на збереженість біологічних об'єктів під час заморожування – швидкість охолодження [23, 24]. В представленому дослідженні ми використовували неконтрольовані режими повільного охолодження в холодильних камерах до -20 , -40 , -75 °C та заморожування до -196 °C зі швидкістю 1 град. / хв. на першому етапі. Ці режими охолодження забезпечили вихідну життєздатність іммобілізованих мікроорганізмів після процесу заморожування до вказаних температур. Найбільш чутливими до наступного зберігання при -20 , -40 , -75 °C були іммобілізовані дріжджі *S. cerevisiae*. Показники життєздатності бактерій *E. coli* M–17 та *L. acidophilus* були вищими. Це пов'язано із видовими відмінностями в будові клітин та їх функціональними особливостями.

На всіх термінах зберігання, починаючи з першого місяця, у всіх зразках гелю життєздатність мікробних клітин була тим вищою, чим нижче температура зберігання. Це повністю відповідає загальноприйнятим положенням про механізми кріопшкоджень і кріозахисту біологічних об'єктів [23, 25, 26]. Температура зберігання -20 °C відноситься до мінімально низьких температур (-11 ÷ -20 °C), які для більшості розчинів електролітів є евтектичними [23, 25, 27].

Рис. 3. Життєздатність дріжджів *S. cerevisiae*, іммобілізованих в носіях з альгінатного гелю, після зберігання протягом 24 місяців за температур -20 , -40 , -75 і -196 °C. Усі відмінності достовірні ($p < 0,05$), окрім відмінностей між показниками життєздатності клітин, що зберігалися при -196 °C протягом 12 і 24 місяців.

Рис. 4. Адгезивна активність бактерій *E. coli* M-17 до еритроцитів.

Рис. 5. Адгезивна активність бактерій *L. acidophilus* до еритроцитів. Рис. 6. Адгезивна активність дріжджів *S. cerevisiae* до еритроцитів.

Протягом усього терміну зберігання за цієї температури на клітини діє як холодний фактор, так і низка пошкоджуючих фізико-хімічних факторів, поява яких пов'язана із процесами позаклітинної та внутрішньоклітинної кристалізації води [23, 26]. В той же час на фоні зупинки метаболічних реакцій в клітинах відбуваються катаболічні процеси [25, 27]. Відповідно, у всіх зразках гелю за температури -20°C спостерігали максимальну загибель іммобілізованих клітин. Температура зберігання -40°C відноситься до

помірно низьких температур (від -21°C до -60°C). При цих температурах основна маса позаклітинної та внутрішньоклітинної води замерзає [24, 25]. В закристалізованій льодовій матриці зберігаються мікрофази із концентрованими розчинами солей. Метаболічні процеси в клітинах відсутні, але частина клітин пошкоджується під дією рідких мікрофаз та холодного фактору. Показники життєздатності у всіх зразках в процесі зберігання були більш високими при -40°C у порівнянні з температурою -20°C . Температу-

ра зберігання -75°C відноситься до зони низьких температур (від -61 до -195°C). Під час зберігання за температури -75°C метаболічні та катаболічні процеси в клітинах відсутні. Позаклітинна вода, вільна та більша частина зв'язаної внутрішньоклітинної води знаходяться в замороженому стані зі стійкою кристалізацією. Відповідно, у зразках, які зберігалися при цій температурі, були найбільш високі показники життєздатності клітин. Але в процесі зберігання частина клітин загинула. Найбільш імовірно, це пов'язано з наступними чинниками. Існує декілька фракцій води, зв'язаних із біополімерами. Фракції води, які знаходяться на поверхні або в замкнених порожнинах біополімерів, під час заморожування мають розмиту зону кристалізації впритул до -70 , -80°C [27]. Також показано, що на відміну від простих сольових розчинів в клітинних суспензіях, які містять високомолекулярні розчинені речовини, залишкова висококонцентрована суміш розчинених речовин, витиснених кристалами льоду в малі об'єми рідкої фази, переходить у скловидну матрицю в діапазоні температур від -100 до -120°C [28, 29, 30]. Завдяки збереженню вказаних кристалізаційних процесів під час перебування зразків при -75°C у частини клітин виникли летальні пошкодження.

При температурах -20 , -40 , -75°C клітини знаходилися весь термін зберігання під дією вказаних вище пошкоджуючих факторів, кількість та вираженість яких залежала від температури зберігання. Внаслідок цього частина клітин в процесі зберігання гинула. Оскільки хімічні та біохімічні реакції в клітинах та фізико-хімічні зміни в заморожених зразках відбуваються повільно, то кількість нелетальних пошкоджень клітин накопичується зі збільшенням термінів зберігання до критичних значень і переходить в летальні пошкодження. Це явище демонструє динаміка змін показників життєздатності клітин: 100%-а збереженість клітин після охолодження та зберігання протягом перших 1–3 місяців і поступове збільшення кількості загинувших клітин протягом наступних термінів.

Температуру зберігання -196°C (кріоконсервування) відносять до ультранизких. При цій температурі уся внутрішньоклітинна і позаклітинна вода замерзає. Призупинені усі хімічні і фізичні процеси, за виключенням переходів електронів в атомах молекул між орбіталями. Клітини знаходяться в стані холодового анабіозу [23, 25, 26]. Під час кріоконсервування нелетальні та летальні пошкодження клітин відбуваються лише на етапах заморожування та відігріву. В нашому дослідженні використані режими охолодження-відігріву у поєднанні з кріозахисними властивостями гелевих носіїв забезпечили 100%-у збереженість життєздатності іммобілізованих мікробних клітин протягом усього терміну спостереження.

Додавання до складу альгінатного гелю дисахаридів лактози і сахарози, середовища СМЛ

та молока підвищувало кріозахисні властивості гелевих носіїв. Враховуючи механізми кріозахисної дії дисахаридів як позаклітинних кріопротекторів [25, 26], можна вважати, що лактоза і сахароза, внесені до складу гелю, за рахунок гідратації зменшують кількість вільної позаклітинної води, а за рахунок осмотичної дії – вміст внутрішньоклітинної води. В результаті зменшуються кріопошкодження клітин під час кристалізаційних процесів. Механізми кріозахисної дії молока в складі гелю потребують окремого дослідження. Найбільш імовірно, молоко стабілізує клітинні стінки. Під час використання середовища СМЛ спостерігали сумісну захисну дію молока, сахарози і лактози.

Результати дослідження адгезивної активності мікроорганізмів свідчать, що іммобілізація клітин в альгінатному гелі без добавок та в гелі з додаванням до його складу лактози, сахарози і молока, охолодження іммобілізованих мікроорганізмів до -20 , -40 , -75°C і зберігання за цих температур протягом 24 місяців не впливають на поверхневі структури, які забезпечують здатність мікробних клітин до адгезії до еритроцитів людини. Слід очікувати, що структури, які забезпечують адгезію пробіотичних штамів мікроорганізмів до поверхневих структур слизової оболонки кишечника, також зберігаються в умовах консервування, використаних у дослідженні.

Окремо слід розглянути значення отриманих результатів для розробки технологій довгострокового зберігання комерційних пробіотичних препаратів, продуктів лікувально-профілактичного харчування і кормових добавок на основі іммобілізованих мікроорганізмів-пробіотиків. Найбільш ефективним виявилось зберігання при -196°C . Але цей метод консервування потребує спеціального кріогенного обладнання, гарантованого постачання рідкого азоту, технічного персоналу зі спеціальною освітою, низки заходів із безпеки експлуатації кріогенного обладнання. Під час зберігання при -20°C відбуваються значні втрати життєздатних клітин. Найбільш перспективними для використання в медицині, ветеринарії, торгівельних мережах і в сільському господарстві є режими зберігання при -40 та -75°C . Для цього потрібно виготовляти іммобілізовані препарати та харчові продукти з високою вихідною кількістю життєздатних клітин і використовувати в якості носіїв гелі, модифіковані додаванням до їх складу кріопротективних речовин.

Висновки

Під час довгострокового зберігання за низьких температур на життєздатність іммобілізованих в гелевих гранулах мікроорганізмів впливають їх видова кріорезистентність, температурні режими і термін зберігання, склад гелевого носія. В порівнянні із пробіотичними штамми *E. coli* та *L. acidophilus* дріжджі *S. cerevisiae* більш чутливі до дії пошкоджуючих чинників, які супро-

воджують процес зберігання за температур -20 , -40 , -75 °C. Під час повільного заморожування до температур -20 , -40 , -75 , -196 °C іммобілізовані в альгінатному гелі з добавками та без них клітини *E. coli*, *L. acidophilus* та *S. cerevisiae* не гинуть. Починаючи з 1–3-го місяців зберігання при -20 , -40 , -75 °C частина клітин гине, найбільше – при -20 °C, найменше – при -75 °C. Під час зберігання при -196 °C іммобілізовані мікробні клітини не гинуть.

Додавання до складу 1%-го альгінатного гелю дисахаридів, знежиреного молока, середовища СМЛ (лактози 1%, сахарози 2%, молока 5%) підвищує його кріопротективні властивості.

Іммобілізація в альгінатному гелі та зберігання протягом 24 місяців (термін спостереження) не впливають на адгезивні властивості пробіотичних штамів *E. coli*, *L. acidophilus*, *S. cerevisiae* по відношенню до еритроцитів людини.

Перспективи подальших досліджень

Отримані результати можуть бути основою подальших досліджень по обґрунтуванню параметрів технологічних процесів довгострокового зберігання пробіотичних штамів мікроорганізмів, іммобілізованих в гелевих носіях.

Література

- Drannik GN, Kurchenko AI, Drannik AG. Immunnaya sistema slizistyyh, fiziologicheskaya mikroflora i probiotiki [Mucosal immune system, physiological microflora and probiotics]. K: Poligraf plus; 2009. 143 s. (Russian)
- Edeas M, Konturek PC, editors. Towards Clinical Evolution. Abstract book of the 7th World Congress on Targeting Microbiota 2019; 2019 Oct 10-11; Krakov, Poland: International Society of Microbiota, 2019.
- Kolesnikova OV. Kyshkova mikrobiota i metabolichniy syndrom: shcho yikh obiednuie? [The intestinal microbiota and metabolic syndrome: the unifying factors]. Suchasna gastroenterologiya. 2016; 2: 61-70. (Ukrainian). Available from: http://nbuv.gov.ua/UJRN/SGastro_2016_2_9.
- Tkachenko EI. Disbioz kishchnika: rukovodstvo po diagnostice i lecheniju [Intestinal dysbiosis: a guide for diagnosis and treatment]. SPb: InformMed; 2009. 276 s. (Russian)
- Bondarenko AV. Korektsiya dysbiotychnykh staniv i stabilizatsiya mikrobioty [Correction of dysbiotic states and microbiota stabilization]. Problemy bezperervnoi medychnoi osvity ta nauky. 2014; 2: 77-80. (Ukrainian)
- Floch MH. Recommendations for Probiotic Use in Humans - 2014 Update. Pharmaceuticals (Basel). 2014 Oct 10; 7(10): 999–1007. doi: 10.3390/ph7100999
- Guarner F, Khan AG, Garisch J, Eliakim R, Gangl A, Thomson A, et al. World Gastroenterology Organisation Global Guidelines: probiotics and prebiotics. J Clin Gastroenterol. 2012 Jul; 46(6): 468-81. doi: 10.1097/MCG.0b013e3182549092
- Singh VP, Sharma J, Babu S, Rizwanulla, Singla A. Role of probiotics in health and disease: a review. J Pak Med Assoc. 2013 Feb; 63(2): 253-7.
- Gbassi GK, Vandamme T. Probiotic Encapsulation Technology: From Microencapsulation to Release into the Gut. Pharmaceutics. 2012 Feb 6; 4(1): 149–163. doi: 10.3390/pharmaceutics4010149
- Mitropoulou G, Nedovic V, Goyal A, Kourkoutas Y. Immobilization Technologies in Probiotic Food Production. Int J Nutr Metab. 2013 Oct 28; 2013: 716861. <https://doi.org/10.1155/2013/716861>
- Yeung TW, Üçok EF, Tiani KA, McClements DJ, Sela DA. Microencapsulation in Alginate and Chitosan Microgels to Enhance Viability of *Bifidobacterium longum* for Oral Delivery. Front Microbiol. 2016 Apr 19; 7: 94. doi: 10.3389/fmicb.2016.00494
- Terpou A, Papadaki A, Lappa IK, Kachrimanidou V, Bosnea LA, Kopsahelis N. Probiotics in Food Systems: Significance and Emerging Strategies Towards Improved Viability and Delivery of Enhanced Beneficial Value. Nutrients. 2019 Jul 13; 11(7): 591. doi: 10.3390/nu11071591
- Kalinichenko SV, Babych YeM, Ryzhkova TA, Maslii IH, Korotkykh OO, Danilina SS, et al. Suchasnyi stan rozrobky ta zastosuvannya probiotychnykh, prebiotychnykh ta synbiotychnykh preparativ [State of the art in development and use of probiotic, prebiotic and synbiotic drugs]. Annaly Mechnykovskoho instytutu. 2013; 3: 5-12. (Ukrainian). Available from: http://nbuv.gov.ua/UJRN/ami_2013_3_3
- Tanimomo J, Delcenserie V, Taminiau B, Daube G, Saint-Hubert C, Durieux A. Growth and Freeze-Drying Optimization of *Bifidobacterium crudilactis*. Food Nutr Sci. 2016 Jun 29; 7(7): 616-26. <http://dx.doi.org/10.4236/fns.2016.77063>
- Afanaseva OV. Mikrobiologicheskii kontrol hlebopekarnogo proizvodstva [Microbiological control of bakery production]. M: Pischevaya promyshlennost; 1976. 144 s. (Russian)
- Patent Ukrainy № 56674. Sposib konservuvannya kultury *Bifidobacterium bifidum* LVA-3 [Method for preservation of *Bifidobacterium bifidum* LVA-3 culture]. / Pavlenko NV, Holtsev AM, Vysekantsev IP, Shchehlov AV, Ananina Hle, Hrysha IH, vynakhidnyky. Instytut problem kriobiologii i kriomeditsyny NAN Ukrainy, patentovlasnyk. 2011 Ver 25. (Ukrainian)
- Labinskaja AC. Mikrobiologiya s tehnikoj mikrobiologicheskikh issledovaniy [Microbiology with microbiological research technique]. 4th ed. M: Medicina; 1978; 23 s. (Russian)
- Tsen JH, Huang HY, Lin YP, King AE. Freezing resistance improvement of *Lactobacillus reuteri* by using cell immobilization. J Microbiol Methods. 2007 Sep; 70(3): 561-4. doi: 10.1016/j.mimet.2007.06.004
- Lusta KA, Fihte BA. Metody opredeleniya zhiznesposobnosti mikroorganizmov [Methods for determining the viability of microorganisms]. Pushhino: ONTI NCBI AN SSSR; 1990. 186 s. (Russian)
- Ivonin AG, Oborin VA. Razrabotka i perspektivy primeneniya fotometricheskogo metoda opredeleniya bakteriofiksiruyushey aktivnosti eritrotsitov v veterinarii [Development and prospects of application of photometric method for determining the bacteriofixing activity of erythrocytes in veterinary medicine]. Izvestiya Orenburgskogo gosudarstvennogo agrarnogo universiteta. 2008; 3(19): 80-2. (Russian)
- Brilis VI, Brilen TA, Lentsner HP. Metodika izucheniya adgezivnogo protsessa mikroorganizmov [Methodology for studying the adhesive process of microorganisms]. Laboratornoe delo. 1986; (4): 210-212. (Russian)
- Mironov AN, redaktor. Rukovodstvo po provedeniju doklinicheskikh issledovaniy lekarstvennykh sredstv [Guidelines for conducting preclinical trials of drugs]. M: Grif i K; 2012. Part I; 944 s. (Russian)
- Gordienko EA, Pushkar NS. Fizicheskie osnovy nizkotemperaturnogo konservirovaniya kletochnykh suspenziy [Physical basis of low-temperature preservation of cell suspensions]. K: Nauk. dumka; 1994. 143 s. (Russian)
- Goltsev AN, redaktor. Aktualnyye problemy kriobiologii i kriomeditsyny [Actual problems of cryobiology and cryomedicine]. Kharkov; 2012. s. 9-44. (Russian)
- Belous AM, Grisichenko VI. Kriobiologiya [Cryobiology]. K: Naukova dumka; 1994. 430 s. (Russian)
- Fuler B, Grin K, Grishchenko VI. Kriokonservirovanie dlja sozdaniya banka kletok: sovremennye koncepcii na rubezhe XXI stoletiya [Cryopreservation for cell banking: contemporary concepts at the turn of the 21st century]. Probl kriobiol. 2003; (2): 62-83. (Russian)
- Nardid OV. Vliyanie nizkikh temperatur na belkovye sistemy [The effect of low temperatures on protein systems]. Probl kriobiol kriomed. 2014 Jun; 24(2): 83-101. (Russian) Available from: <http://cryo.org.ua/journal/index.php/probl-kriobiol-kriomed/article/view/555>
- Boutron P, Mehl P, Kaufann A, Angibaud P. Glass forming tendency and stability of the amorphous state in the aqueous solutions of linear polyalcohols with four carbons. Cryobiology. 1986 Oct 01; 23(5): 453-469. DOI: 10.1016/0011-2240(86)90031-3
- MacFarlane D. Physical aspects of vitrification in aqueous solutions. Cryobiology. 1987 Jun; 24(3): 181-195. [https://doi.org/10.1016/0011-2240\(87\)90022-8](https://doi.org/10.1016/0011-2240(87)90022-8)
- Rall W, Reid D, Farrant J. Innocuous biological freezing during warming. Nature. 1980 Jul 31; 286(5772): 511-4. doi: 10.1038/286511a0

Реферат

ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ И АДГЕЗИЯ К ЭРИТРОЦИТАМ ЧЕЛОВЕКА ПРОБИОТИЧЕСКИХ ШТАММОВ МИКРООРГАНИЗМОВ ПОСЛЕ ИММОБИЛИЗАЦИИ В АЛЬГИНАТНЫХ ГЕЛЯХ И ХРАНЕНИЯ ПРИ РАЗЛИЧНЫХ НИЗКИХ ТЕМПЕРАТУРАХ

Высеканцев И.П., Петров И.В., Буряк И.А., Марценюк В.Ф.

Ключевые слова: пробиотики, иммобилизация, альгинатный гель, низкотемпературное хранение.

Исследование посвящено разработке технологий длительного хранения иммобилизованных в гелевых носителях пробиотиков при различных низких температурах. Цель исследования – изучить сохрannость и адгезивную активность микроорганизмов-пробиотиков после иммобилизации в альгинатном геле и хранения при различных низких температурах в течение 24 месяцев (срок наблюдения). Объекты и методы исследования. Пробиотические штаммы микроорганизмов *Escherichia coli* M-17 (*E. coli* M-17), *Lactobacillus acidophilus* IMB B-2637 (*L. acidophilus*), *Saccharomyces cerevisiae* IMB Y-505 (*S. cerevisiae*) были иммобилизованы в 1%-ном альгинатном геле без добавок или с добавлением лактозы, сахарозы, обезжиренного молока и защитной сахарозо-молочно-лактозной среды. Образцы замораживали с неконтролируемыми скоростями охлаждения в холодильных камерах с температурами –20, –40, –75 °C. Во время замораживания до –196 °C образцы охлаждали до –40 °C со скоростью 1 град. / мин, а затем погружали в жидкий азот. Образцы хранили при указанных температурах в течение 24 месяцев (срок наблюдения). В процессе хранения часть гранул отогревали на водяной бане и растворяли в 4% ЭДТА. Жизнеспособность определяли по способности микробных клеток образовывать колонии на агаризованных средах. Адгезивную активность определяли по способности микроорганизмов адгезировать к эритроцитам человека 0 (I) группы, Rh (+). Полученные результаты и обсуждение. После охлаждения до –20, –40, –75, –196 °C и последующего хранения при –196 °C иммобилизованные микроорганизмы во всех видах геля не погибали. При –20, –40, –75 °C в большинстве образцов гибель клеток начиналась между первым и 3-м месяцами хранения. Через 24 месяца было установлено, что наиболее устойчивыми к хранению при этих температурах были бактерии *L. acidophilus*, а наиболее чувствительными – дрожжи *S. cerevisiae*. Показатели жизнеспособности всех микроорганизмов, иммобилизованных в 1%-ном геле без добавок, были минимальными. Добавление в состав альгинатного геля дисахаридов лактозы, сахарозы, сахарозо-молочно-лактозной среды и молока повышало криопротективные свойства альгинатного геля. Наиболее высокую жизнеспособность иммобилизованных микроорганизмов наблюдали в геле с добавлением сахарозо-молочно-лактозной среды. С понижением температуры хранения от –20 до –75 °C количество жизнеспособных микробных клеток во всех образцах геля повышалась. Иммобилизация в гелевых носителях и хранение в течение 24 месяцев не влияли на адгезивные свойства пробиотиков *E. coli* M-17, *L. acidophilus*, *S. cerevisiae*. Изменения показателей жизнеспособности микробных клеток связаны с выраженностью повреждающих физико-химических факторов, сопровождающих процессы кристаллизации воды при температурах –20, –40, –75 °C. Анализируется защитное действие добавок в состав альгинатного геля. Выводы. Во время длительного хранения при различных низких температурах на жизнеспособность иммобилизованных в гелевых гранулах микроорганизмов влияют видовая криорезистентность микроорганизмов, температурные режимы и сроки хранения, состав гелевого носителя. Процессы иммобилизации и хранения при низких температурах не меняли адгезивную активность иммобилизованных микроорганизмов.

Summary

VIABILITY OF PROBIOTIC STRAINS OF MICROORGANISMS AND THEIR ADHESION TO HUMAN ERYTHROCYTES AFTER IMMOBILIZATION IN ALGINATE GEL AND STORAGE AT DIFFERENT LOW TEMPERATURES

Vysokantsev I.P., Petrov I.V., Buriak I.A., Martsenyuk V.P.

Key words: probiotics, immobilization, alginate gel, low-temperature storage.

The research was focused on the development of technologies for long-term storage of probiotics immobilized in gel carriers at various low temperatures. The aim of the research was to investigate the viability and adhesive activity of probiotic microorganisms after immobilization in an alginate gel and storage at various low temperatures for 24 months (observation period). Probiotic strains of the microorganisms *Escherichia coli* M-17 (*E. coli* M-17), *Lactobacillus acidophilus* IMB B-2637 (*L. acidophilus*), *Saccharomyces cerevisiae* IMB Y-505 (*S. cerevisiae*) were immobilized in 1% alginate gel either without additives or supplemented with lactose, sucrose, skimmed milk and protective SML medium. The samples were frozen at uncontrolled cooling rates in refrigerators with temperatures of –20, –40, –75 °C. When then frozen down to –196 °C, the samples were cooled to –40 °C at the rate of 1 deg / min, and then immersed in liquid nitrogen. The samples were stored at the indicated temperatures for 24 months (observation period). During storage, part of the granules was thawed in a water bath and dissolved in 4% EDTA solution. The viability of microorganisms was determined by the ability of microbial cells to form colonies on agar media. Adhesive activity was determined by the ability to adhere to human erythrocytes 0(I) group, Rh (+). When cooled down to –20, –40, –75, –196 °C and after subsequent storage at –196 °C, immobilized microorganisms in all varieties of gel did not die. In most samples cells died between 1 and 3 months of storage at –20, –40, –75 °C. After 24 months, it was found that the most resistant to storage at these temperatures were the bacteria

L. acidophilus, and the most sensitive were the yeast *S. cerevisiae*. The viability of all microorganisms immobilized in 1% gel without additives was minimal. The addition of disaccharides of lactose, sucrose, SML medium and milk to the alginate gel increased the cryoprotective properties of the alginate gel. The highest viability of immobilized microorganisms was observed in the gel with SML medium. As the storage temperature decreased from -20 to -75 °C, the number of viable microbial cells in all gel samples increased. Immobilization in gel carriers and storage for 24 months did not affect the adhesive properties of probiotics *E. coli* M-17, *L. acidophilus*, *S. cerevisiae*. The changes in the viability of microbial cells are associated with the severity of damaging physicochemical factors that accompany the processes of water crystallization at temperatures of -20 , -40 , -75 °C. The protective effect of additives in the composition of the alginate gel is analyzed. The viability of microorganisms immobilized in gel granules during long-term storage at different low temperatures is influenced by the species cryoresistance of microorganisms, temperature regimens and storage duration, the composition of the gel carrier. The processes of immobilization and storage at low temperatures did not change the adhesive activity of immobilized microorganisms.

DOI 10.31718/2077-1096.20.4.124

УДК 616.314-018.4-003.93-085.272.2:612.015.31]-073.756.8-036-092.9

Ган І.В., Фурдичко А.І., Ільчишин М.П., Федун І.Р., Пороховська Н.В.

ХАРАКТЕРИСТИКА ВПЛИВУ ОСТЕОТРОПНИХ ПРЕПАРАТІВ НА РЕГЕНЕРАЦІЮ КІСТКОВОЇ ТКАНИНИ НА ОСНОВІ АНАЛІЗУ КАЛЬЦІЙ-ФОСФОРНОГО ОБМІНУ В ЕКСПЕРИМЕНТІ ТА КЛІНІЧНО-РЕНТГЕНОЛОГІЧНИХ ОБСТЕЖЕНЬ ПАЦІЄНТІВ

Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького

Лікування хворих на хронічний періодонтит є однією з важливих і не повністю вирішеною проблемою сучасної стоматології, що спонукало до пошуку нових ефективних методів лікування. Метою нашого дослідження було оцінити ефективність впливу на інтенсивність регенераційних процесів в кістковій тканині композиції на основі гідроксіапатиту кальцію в експерименті, аналізуючи результати кальцій-фосфорного обміну, а також проаналізувати ефективність лікування хворих на хронічний гранулюючий періодонтит з набитою широкою верхівкою кореня зуба, розпрацьованою композицією та порівняти з результатами використання загальноприйнятого матеріалу мінерал триоксид агрегат. Матеріали та методи дослідження. Усі тварини були розподілені на 4 дослідні групи, яким створили деструкцію кісткової тканини та заповнили її досліджуваними матеріалом, окрім групи порівняння. Виведення з експерименту проводили на 14 та 90 добу. У гомогенаті кісткової тканини досліджували вміст кальцію та фосфору. 59 хворих розподілено на дві групи: у дослідній групі проводили пломбування апікальної ділянки кореня запропонованою нами композицією, а у групі порівняння – пломбування верхівки кореня матеріалом мінерал триоксид агрегат. Результати та їх обговорення. На 14 добу спостерігали найбільше зниження іонів кальцію та фосфору у 2-й дослідній групі у 1,8 раза, а у 4-й – лише у 1,3 раза. На 90 добу вміст іонів кальцію та фосфору все ще залишався нижчим відносно показників групи контролю у 1,6 та 1,5 раза відповідно, а у 4-й групі у 1,01 та 1,1 раза. Аналіз результатів лікування хворих через 6 місяців свідчить про зниження значення індексу у дослідній групі в 1,4 раза, а в контрольній - в 1,1 раза. Через 12 місяців у дослідній групі індекс зменшився в 1,9 раза, а у групі порівняння лише в 1,4 раза. Висновок. Експериментально, клінічно та рентгенологічно доведено, що запропонована композиція ефективніше стимулює процеси біорегенеративної та регенерації тканин періодонту порівняно із загальноприйнятим препаратом мінерал триоксид агрегат.

Ключові слова: хронічний гранулюючий періодонтит, композиція на основі гідроксіапатиту кальцію, регенерація, кальцій-фосфорний обмін, індекс стану деструкції верхівкового періодонтиту (СДВП).

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дана робота є фрагментом теми дослідження кафедри терапевтичної стоматології Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького "Розробка та вдосконалення методів діагностики, профілактики та лікування пародонту, карієсу та його ускладнень", № держ. реєстрації 0120U002139.

Вступ

Хронічні форми періодонтиту займають вагоме місце серед усіх стоматологічних захворювань та залишаються актуальною проблемою сучасної медицини. У працездатного населення молодого віку спостерігається помітна тенденція до збільшення випадків захворювань на хронічні форми періодонтиту. Це зумовлено складністю діагностики та досить часто відсутністю трива-

лих позитивних результатів після проведеного ендодонтичного лікування [1, 2]. Довготривалий безсимптомний перебіг хронічних форм періодонтиту спричиняє наростання деструкційних процесів не лише в тканинах періодонту та альвеолярній кістці, але й сприяє резорбції цементу та дентину кореня, що зумовлює утворення набитої широкої верхівки кореня зуба. Головними завданнями під час лікування хворих на хроніч-