

3. Инжеваткин Е.И. Практикум по экспериментальной онкологии на примере клеток асцитной карциномы Эрлиха. – Красноярск, 2004.
4. Митюшин В.М. Ультраструктура раковой клетки на примере клеток асцитной карциномы Эрлиха. - М., 1964.
5. Carini R, de Cesaris MG, Bellomo G, Albano E. Role of Na⁺/Ca²⁺ exchanger in preventing Na⁺ overload and hepatocyte injury: opposite effects of extracellular and intracellular Ca²⁺ chelation//Biochem Biophys Res Commun. – 1997. - № 232(1). P. 107-110.
6. Carini R., Bellomo G., Grazia De Cesaris M., Albano E. Glycine protects against hepatocyte killing by KCN or hypoxia by preventing intracellular Na⁺ overload in the rat // Hepatology. – 1997. - № 26(1). – P. 107-112.
7. Досон Р., Элиот Д., Элиот У., Джонс К./Справочник биохимика. - М., 1991.
8. Johan W.M., Heemskerk, Marion A.H. Feijge et all. // Function of intracellular [Ca²⁺]_i in exocytosis and transbilayer movement in human platelets surface-labeled with the fluorescent probe 1-(4-trimethylammonio)phenyl)-6-phenyl-1,3,5-hexatriene// Biochimica et Biophysica Acta. -1993. - № 1147. – P. 194-204.
9. Zoccarto F., Cavalli L., Alexandre. The pH-sensitive dye acridine orange as a tool to monitor exocytosis/endocytosis in synaptosomes// J. Neurochem. – 1999. - № 72. – P. - 625-633.
10. Ладыгина М.Е., Рубин А.Б. Биофизические методы в физиологии растений. - М.: Издательство «Наука», 1971.
11. Green K.N., Boyle J.P., Peers C. Hypoxia potentiates exocytosis and Ca²⁺ channels in PC12 cells via increased amyloid β peptide formation and reactive oxygen species generation // Journal of Physiology. - 2002. - № 541(3). – P. 1013-1023.
12. Sausen K.P., Bower E.A., Stiney M.E., et all. Effects of intermittent hypoxia training on the electroencephalogram complexity and saturation of blood oxygen of high performance fighter pilots//Aviat Space Environ. Med. – 2003. - № 74(11). – P. 1190-1197.
13. Gebhardt C., Heinemann U. Anoxic decrease in potassium outward currents of hippocampal cultured neurons in absence and presence of dithionite//Brain Res. – 1999. - №7; 837(1-2). - P. 270-276.
- Carpenter E., Hatton C.J., Peers C. Effects of hypoxia and dithionite on catecholamine release from isolated type I cells of the rat carotid body//J. Physiol. – 2000. - №15;523 (3). – P. 719-729.
14. Archer S.L., Hampl V., Nelson D.P. et all. Dithionite Increases Radical Formation and Decreases Vasoconstriction in the Lung // Circ Res. – 1995. - № 77 (1). – P. 174 – 181.
15. Pelletier M., Lavastre V., Girard D. Activation of Human Epithelial Lung A549 Cells by the Pollutant Sodium Sulfite: Enhancement of Neutrophil Adhesion //Toxicological Sciences. - 2002. № 69. – P. 210-216.
16. Abdrasilov B.S., Kim Yu.A., Nurieva R.I., et all. The effect of total saponins from Panax Ginseng C.A. Meyer on the intracellular signaling system in Ehrlich ascites tumor cells//Biochemistry and Molecular Biology International. – 1996. - №38 (3). – P. 519-526.
17. Пальмина Н.П., Мальцева Е.Л. Состав фосфолипидов ядер клеток печени и опухоли в процессе роста асцитной карциномы Эрлиха и при облучении животных-опухоленосителей // Биохимия. – 1982. № 47 (1). – P. 115-125.

Түйін

Асцитті карциномды Эрлих жасушасының тіршілік етуіне перфтордекалиннің гипоксия жағдайындағы әсері зерттелді. Перфтордекалиннің гипоксия және гиперкалий ортасы жағдайында болуы жасушалардың тіршілік етуінің процентін арттырған. Гиперкалий ортасы лизофосфолипидтер құрамының артуын және перфтордекалин үлгілеріндегі осфатидилэтаноламиннің құрамының азаюын туындатады.

Summary

This investigation deals with the perftordecalin influence to the Ehrlich's ascites tumor cells viability under the hypoxia. It was found that the cell survival fraction was increased in the perftordecalin presence in the hypoxia and hyperpotassium combination conditions. The hyperpotassium nutrient caused the enhancement of lysophospholipids content at the cells. And at the samples that the perftordecalin contained the phosphatydyethanolamine level was decreased.

Савицкая И.С.

ЛАБОРАТОРНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ СОРБИРОВАННЫХ ПРОБИОТИКОВ КАК БИОКОРРЕКТОРОВ МИКРОЭКОЛОГИЧЕСКИХ НАРУШЕНИЙ

Кафедра микробиологии КазНУ им. аль-Фараби

Нарушения биологического равновесия нормофлоры кишечника, встречающиеся практически у каждого в определенный жизненный период, обуславливают интенсивное развитие пробиотической микробиологии и биотехнологии. К настоящему времени в этой отрасли наметились две основные проблемы, решение которых будет способствовать

повышению эффективности действия пробиотиков. Первая – их адресная доставка в толстый кишечник, поскольку при прохождении через желудок и двенадцатиперстную кишку большинство клеток погибает. Вторая – обеспечение длительной транзитной колонизации кишечного эпителия экзогенными пробиотическими бактериями, чего обычно не происходит. Одним из путей решения обозначенных проблем является создание иммобилизованных форм пробиотиков, в которых бактериальные клетки прикреплены к поверхности носителя-энросорбента. В этом качестве особый интерес представляют активированные угли нового типа, полученные путем высокотемпературной карбонизации и последующей активации отходов растительного происхождения, таких как скорлупа грецких и кокосовых орехов, абрикосовые косточки, рисовая шелуха и т.п. Несомненным достоинством этих сорбентов является то, что производятся они из дешевого, причем ежегодно возобновляемого растительного сырья. Большая удельная поглощающая поверхность карбонизованных материалов обеспечивают наличие у них высоких детоксикационных, а широкий диапазон размеров пор – прикрепительных свойств. Т.е. гранула сорбента с хорошо развитой пористой структурой по существу уже является почти готовой микрокапсулой для клеток бактерий-пробиотиков [1].

Это послужило основанием для изучения эффективности действия пробиотиков-биосорбентов на основе нового материала – зауглероженной рисовой шелухи (ЗРШ), полученного путем высокотемпературной карбонизации исходного сырья в Институте проблем горения КазНУ им. аль-Фараби. В качестве пробиотического компонента использованы штаммы бактерий рода *Lactobacillus*, принадлежащие к трем наиболее типичным видам интестинальной лактофлоры: *L.fermentum AK-2R*, *L.acidophilus AA-1* и *L.plantarum AP-1*. Все штаммы выделены из кишечника человека и обладают хорошими пробиотическими параметрами, т.е. имеют высокую антагонистическую и адгезивную активности [2].

Для определения протекторного эффекта сорбента на закрепленные на его поверхности клетки были проведены эксперименты с «модельным желудком», в которых было установлено, что при таком стрессовом воздействии на суспензию клеток лактобактерий их биотитр уменьшается на 4 порядка (рисунок).

Это означает, что при пероральном применении суспензии лактобактерий следует ожидать, что лишь незначительная часть их жизнеспособных клеток достигает толстого кишечника. Данные, полученные на этой лабораторной модели подтверждаются клинико-экспериментальными исследованиями, в которых показано, что под действием желудочного сока и желчи пробиотики теряют более 90% своей активности еще до момента попадания в кишечник [3]. Иммобилизованные клетки штаммов лактобацилл, входящих в состав комплекса оказались намного устойчивей к стрессовому воздействию желудочного сока, нежели свободные. Количество жизнеспособных клеток в этом случае снижается лишь на порядок. Наблюдаемый эффект мог быть связан как с антацидными свойствами носителя [4], так и с тем, что клетки, входящие в состав образованных на сорбенте микроколоний, лучше защищены от бактерицидных факторов и неблагоприятного действия окружающей среды, поскольку могут иметь общую мембрану [5]. В связи с этим, можно предполагать, что иммобилизованные пробиотики могут беспрепятственно преодолевать «желудочный» барьер при их пероральном введении.

Доказательством справедливости выдвинутого предположения являются данные экспериментов, полученных при введении иммобилизованных на ЗРШ клеток лактобацилл в организм млекопитающих, поскольку активность пробиотиков *in vivo* можно оценить по способности приживания экзогенных штаммов. Это обусловлено тем, что клиническая эффективность пробиотиков связана с колонизацией слизистой оболочки кишечника и заместительным восстановлением функций, что обеспечивает создание микробиологической среды, способствующей коррекции собственной микрофлоры. Хотя штаммы бактерий, используемые в производстве пробиотиков, обычно отбираются из состава микрофлоры желудочно-кишечного тракта человека, они, все же не обладают длительной

колониальной резистентностью и элиминируют из кишечника в течение 2-4 недель [3]. Поэтому заместительная терапия должна носить достаточно длительный интермиттирующий характер.

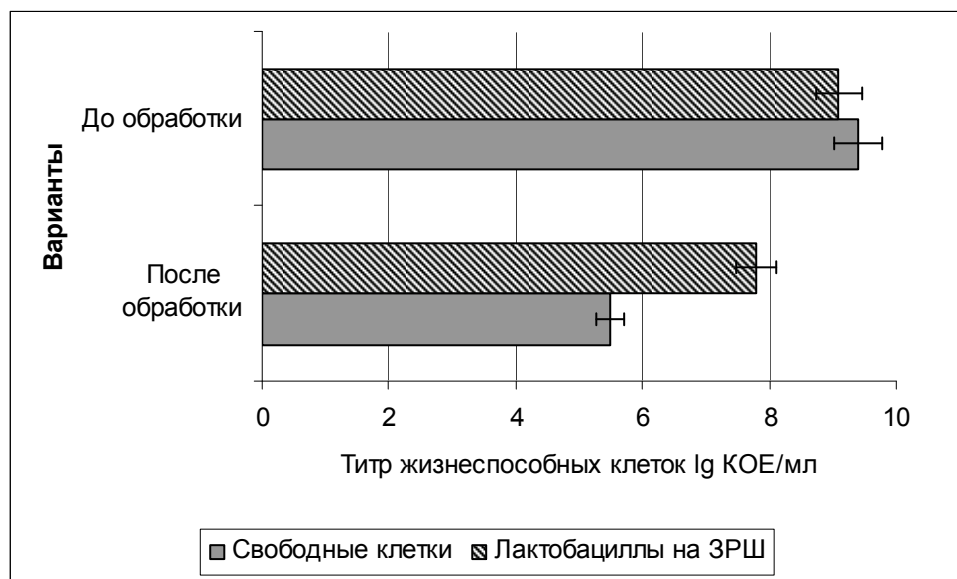


Рисунок - Влияние искусственной желудочной среды на жизнеспособность свободных и иммобилизованных клеток лактобацилл

В этой серии был использован следующий дизайн эксперимента: крысам ежедневно вводили 10^8 КОЕ свободных или иммобилизованных на поверхности ЗРШ клеток лактобацилл в течение 10 дней. У соответствующих экспериментальных групп животных через определенные временные интервалы собирали фекалии, которые высевали на селективную среду с антибиотиками (поскольку входящие в состав препарата штаммы несут селективные маркеры антибиотикорезистентности).

Установлено, что при приеме как свободных, так и иммобилизованных клеток всех трех штаммов, они определяются в фекалиях на второй день, достигая максимума на третий день. При этом титр клеток значительно различается в зависимости от того, в каком состоянии они проходят через желудочно-кишечный тракт животных. Так, если после введения свободных клеток, их максимальное количество составляет $5 \times 10^2 - 8 \times 10^2$ КОЕ/г, то при получении иммобилизованного пробиотика – $2 \times 10^7 - 6 \times 10^7$. Это свидетельствует о лучшем сохранении жизнеспособности клеток в иммобилизованном состоянии и их успешном прохождении через верхние отделы пищеварительного тракта. Однако это не самое главное. После прекращения приема неиммобилизованных пробиотиков концентрация экзогенных лактобацилл в фекалиях снижалась вплоть до полного исчезновения уже через 15 дней. Полученные данные свидетельствуют о том, что при таком способе доставки происходит только кратковременная транзитная колонизация кишечника экзогенными лактобациллами. В то же время при введении сорбированного пробиотика колонии этого штамма обнаруживались даже через 60 дней после окончания приема. Это означает, что в таком состоянии экзогенные пробиотики способны приживляться в организме, что удлиняет сроки колонизации ими кишечного эпителия, даже если они будут со временем замещены собственной флорой.

На микрочастицах сорбента из зауглероженной рисовой шелухи образуются колонии, состоящие из 40-200 клеток лактобацилл. Поскольку доказано, что заселение бифидобактериями участка слизистой кишечника размером 1 мм^2 достигается при взаимодействии с ним колоний, состоящих не менее, чем из 20 клеток [6], можно предполагать, что этим может быть обусловлено заселение слизистой кишечника бактериями при введении их в организм хозяина в виде микроколоний, иммобилизованных на сорбенте.

Активность пробиотиков традиционно исследуют либо на прямых и косвенных моделях инфицирования, либо экспериментального дисбактериоза. Для этого была проведена серия экспериментов с лабораторными животными - беспородными крысами, у которых с помощью антибиотика ампиокса индуцировали дисбактериоз, после чего исследовали состав просветной микрофлоры. За основные критерии бактериологической эффективности введения опытным животным свободных и иммобилизованных на ЗРШ экзогенных лактобацилл принимали популяционный уровень бифидобактерий и лактобацилл, а также качественные и количественные характеристики содержания в толстом кишечнике условно-патогенных энтеробактерий, стафилококков и кандидозных грибов (таблица).

В этой серии было установлено, что из кишечника крыс, получавших иммобилизованные клетки лактобацилл, выделяется микрофлора, аналогичная той, которая присутствует у животных, включенных в группу позитивного контроля (интактные крысы), т.е. у лабораторных животных, которым вводили КИКЛ, обнаруживали сбалансированные концентрации общего количества аэробной и анаэробной микрофлоры, а содержание условно-патогенных энтеробактерий и дрожжевых грибов после применения иммобилизованного комплексного пробиотика уменьшалось на три порядка. При этом происходило восстановление популяционного уровня представителей индигенной микрофлоры - бифидобактерий и лактобацилл в кишечнике экспериментальных животных. Отметим, что этот эффект был более выраженным по сравнению с использованием комплекса свободных клеток этих штаммов.

Таблица - Состав микрофлоры кишечника после применения лактосодержащих пробиотиков

Группа лабораторных животных	Количество жизнеспособных клеток, lg КОЕ/г				
	<i>Bifidobacterium</i>	<i>Lactobacillus</i>	Условно-патогенные энтеробактерии	<i>Candida</i>	<i>Staphylococcus</i>
1 - ДБ	5,24±0,12	4,35±0,24	5,54±0,22	5,86±0,22	6,81±0,08
2 - КИКЛ	10,25±0,16	7,03±0,18	2,82±0,19	1,93±0,28	5,13±0,27
3 - КСК	8,67±0,19	7,05±0,14	3,28±0,11	3,34±0,13	5,44±0,30
5 - ИЖ	9,82±0,81	7,62±0,19	2,25±0,22	2,34±0,14	5,27±0,19

Примечание: ДБ- животные с экспериментальным дисбактериозом; КИКЛ - животные, получавшие комплекс иммобилизованных клеток лактобацилл; КСК - животные, получавшие свободные клетки бактериальной композиции; ИЖ - интактные животные.

Очевидно, усиление пробиотического эффекта иммобилизованных пробиотиков может быть связано с тем, что, во-первых, прикрепленные к носителю клетки лактобацилл не погибают в верхних отделах пищеварительного тракта и в полном объеме достигают толстого кишечника. Во-вторых, существование лактобацилл на поверхности сорбента в виде микроколоний вызывает стимуляцию продукции ими антимикробных субстанций, поскольку при этом индуцируется «чувство кворума» у этих микроорганизмов. В-третьих, саногенным эффектом обладает и сам сорбент. И, наконец, сорбированные препараты позволяют обеспечить плотную локальную колонизацию слизистых оболочек и, тем самым, быстрее восстанавливают нормофлору и ускоряют репаративные процессы в слизистой оболочке кишечника. Сочетание всех этих факторов повышает эффект нормализации качественного и количественного состава микрофлоры, что приводит к ускорению терапевтического действия препаратов-пробиотиков, предназначенных для устранения дисбактериозов.

Литература

1. Савицкая И.С., Жубанова А.А., Мансуров З.А., Кистаубаева А.С., Тажибаева С.М. Использование наноструктурированных углеродных материалов в медицине. Сообщение 2. Разработка новых пробиотиков, несущих иммобилизованные на наноструктурированной матрице симбиотические бактерии // Вестник КазНУ. Серия химическая. – 2010. - №1 (57). – С. 182-189.
2. Савицкая И.С. Конструирование бактериальной композиции для разработки поликомпонентного сорбированного пробиотика // Вестник КазНУ. Серия биологическая. – 2009. - № 2 (41). – С. 10-14.
3. Решетников В.И. Разработка лекарственных форм препаратов с иммунобиологической и сорбционной активностью // Фармация. – 2002. - №5. – С. 40-44.
4. Бельмер С.В., Малкоч А.В. Кишечная микрофлора и значение пребиотиков для ее функционирования // Лечащий врач. – 2006. - №4. – С. 34-41.
5. Bhinu V.S. Insight into biofilm-associated microbial life. – J. Mol. Microbiol. – 2005. - Vol. 3. – P. 197-214.
6. Серов В.Н., Ильенко Л.Н., Суджан Е.В., Бондаренко В.М. Лечение и профилактика дисбактериоза кишечника бифидумпрепаратами // Новые лекарственные препараты. – 1996. - № 1. – С. 3-9.

Түйін

Сорбцияланған пробиотиктермен дисбактериоз індетін емдеуге болатыны жайлы зерттеулердің нәтижелері ұсынылған. Терапевтикалық механизмдері тұрғысынан мысалдар келтірілген.

Summary

The results of researches reflecting advantages of correction of a dysbacteriosis of intestines sorption probiotics are presented. Mechanisms of their therapeutic effect are considered.

УДК 632.937.15

Смирнова И.Э., Саубенова М.Г.
НОВЫЙ БИОЛОГИЧЕСКИЙ ПРЕПАРАТ ДЛЯ ЗАЩИТЫ
СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ РАСТЕНИЙ ОТ ФИТОПАТОГЕННЫХ ГРИБОВ
РГП «Институт микробиологии и вирусологии» КН МОН РК, e-mail: imv_rk@list.ru

На рубеже XX-XXI веков стало очевидным, что широкое применение химических соединений в сельском хозяйстве отрицательно влияет на окружающую среду, а присутствие в продуктах питания нитратов, нитритов, пестицидов, гербицидов существенно сказывается на здоровье населения и приводит к развитию многих заболеваний, прежде всего, аллергического генеза. В то же время, в высокоразвитых странах неуклонно растет спрос на биологически безопасные продукты, при производстве которых в экологически чистом земледелии не допускается использование организмов, полученных методом генной инженерии, а также применение химических регуляторов роста и пестицидов [1, 2].

Накопление в почве химических соединений обуславливает резкое ухудшение ее плодородия вне зависимости от климатических зон и типов почвы. Образуется замкнутый круг - ухудшение плодородия ведет к снижению урожаев и требует внесения все больших доз минеральных удобрений для обеспечения продуктивности сельскохозяйственных культур. В последнее время использование химических пестицидов и стимуляторов роста сельскохозяйственных культур приобретает неконтролируемый характер и сопровождается опасностью загрязнения ими объектов окружающей среды, что отрицательно влияет на полезную микрофлору почвы, а также стимулирует выработку устойчивых к пестицидам и другим химическим веществам популяций патогенных организмов [3].

Альтернативой применения химических средств защиты и стимуляции роста сельскохозяйственных растений является использование биологических препаратов, действующим началом которых являются микроорганизмы. В России производится большое количество биопрепаратов (Планриз, Агат-25, Триходермин, Псевдобактерин, Экстрасол, Фитоспорин) [4, 5]. Однако их эффективность зависит от множества факторов и, прежде всего, от конкурентоспособности штаммов, входящих в состав биопрепаратов, их отношений с аборигенной микрофлорой и возбудителями заболеваний растений, почвенно-климатических и других региональных условий. На сегодняшний день биопрепаратов,