



УКРАЇНА

(19) **UA**

(11) **108160**

(13) **U**

(51) МПК

C12N 1/20 (2006.01)

C12Q 1/04 (2006.01)

C12R 1/225 (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: **u 2015 11982**

(22) Дата подання заявки: **03.12.2015**

(24) Дата, з якої є чинними
права на корисну
модель: **11.07.2016**

(46) Публікація відомостей
про видачу патенту: **11.07.2016, Бюл.№ 13**

(72) Винахідник(и):

**Осолодченко Тетяна Павлівна (UA),
Крестецька Світлана Леонидівна (UA),
Пономаренко Світлана Володимирівна (UA),**

**Лук'яненко Тетяна Василівна (UA),
Штикер Любов Григоріївна (UA),
Порт Олена Валерівна (UA),
Волянський Дмитро Леонідович (UA)**

(73) Власник(и):

**ДЕРЖАВНА УСТАНОВА "ІНСТИТУТ
МІКРОБІОЛОГІЇ ТА ІМУНОЛОГІЇ ІМ. І.І.
МЕЧНИКОВА НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ
МЕДИЧНИХ НАУК УКРАЇНИ",
вул. Пушкінська, 14, м. Харків, 61057 (UA)**

**(54) ПОЖИВНЕ СЕРЕДОВИЩЕ ДЛЯ ВИДІЛЕННЯ ЛАКТОБАКТЕРІЙ, ЗДАТНИХ ДО ДЕГРАДАЦІЇ
ОКСАЛАТІВ**

(57) Реферат:

Поживне середовище для виділення лактобактерій, здатних до деградації оксалатів, містить декстрозу, білковий гідролізат, пептон ферментативний, екстракт харчових дріжджів, натрій лимоннокислий, цитрат амонію, K_2HPO_4 , Tween®80, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, $MnSO_4 \cdot 4H_2O$, агар мікробіологічний. Додатково містить хлорид кальцію та амонію оксалат.

UA 108160 U

Корисна модель належить до медичної мікробіології, зокрема до бактеріологічних середовищ, а саме є щільним диференціальним середовищем для детекції штамів *Lactobacillus* spp., що мають функціональні ферментативні системи для деградації оксалатів.

В організмі людини оксалати є потенційно токсичним кінцевим продуктом метаболізму гліцину, гліоксилату та аскорбінової кислоти. Крім того, нормальна дієта передбачає надходження 80-120 мг оксалатів на день з їжею. Біодоступність харчових оксалатів може бути досить варіабельною і, за нормальних умов, рівень їх кишкової адсорбції складає біля 10 %. Оскільки в організмі людини та інших ссавців ферментні системи, придатні для деградації оксалату відсутні, він підлягає виведенню, що здійснюється, головним чином, шляхом ренальної екскреції. Зростання концентрації оксалатів в крові внаслідок різноманітних ендегенних або екзогенних причин призводить до розвитку оксалурії (>40mg/24h) та специфічних уражень нирок. Для зменшення токсичного навантаження на нирки існують механізми, що забезпечують екскрецію оксалатів крізь слизову оболонку тонкого кишечника [1], де вони (так саме як і оксалати, що надходять із їжею) мають три варіанти майбутнього: (i) частина (незначна) утворює нерозчинні комплекси з іонами двовалентних металів (головним чином з кальцієм) та виводиться з фекаліями; (ii) частина може бути утилізована тими представниками кишкової мікрофлори, що мають відповідні ферментні системи; (iii) оксалати, що залишились, адсорбуються в дистальних відділах товстого кишечника та потрапляють в кров.

Кишкова мікрофлора здатна до ефективної утилізації оксалатів, зокрема *Oxalobacter formigenes* (для якого оксалати є єдиним джерелом енергії та вуглецю), є досить вразливим компонентом мікробіоценозу, чутливим до дії багатьох загальноновживаних антибіотиків [2]. Чисельні дослідження свідчать, що втрата цього кишкового симбіонту пов'язана з суттєвим зростанням ризику формування кальцій-оксалатних конкрементів у нирках [3]. Слід зазначити, що на сьогодні єдиним доступним методом впливу на оксалатний гомеостаз є дієтичні обмеження, що негативно впливають на якість життя пацієнта та, в більшості випадків, є недостатньо ефективними. Одним з альтернативних напрямків корекції є застосування пробіотичних препаратів [4] і, оскільки досягти стабільної реколонізації кишкового тракту представниками виду *Oxalobacter formigenes* зазвичай досить складно [5], виявлення інших представників нормального кишкового мікробіоценозу з даним видом метаболічної активності є актуальним напрямком досліджень в цій галузі.

Лактобактерії мають тривалу історію використання як компонента пробіотичних препаратів, загальноновизнаний рівень безпечності та чимало корисних властивостей, що сприяють формуванню симбіотичних відносин з макроорганізмом. Секвенування геному окремих представників *Lactobacillus* spp. показало наявність ферментних систем, придатних для деградації оксалатів (зокрема, оксалил-коензим А декарбоксилази (Oxc) та форміл-коензим А трансферази (Frc), ідентичних Oxc та Frc *Oxalobacter formigenes*), а також продемонструвало внутрішньовидову варіабельність цієї ознаки [6]. Останнє означає, що здатність до деградації оксалатів, може бути надбана внаслідок вертикального або горизонтального трансферу відповідних фрагментів геному, або втрачена внаслідок різноманітних генетичних процесів, тобто є штам-специфічною ознакою. Відповідно, оцінка здатності до деградації оксалатів не входить до стандартних схем видової ідентифікації *Lactobacillus* spp. і бактеріологічні середовища, що дозволяють це зробити, відсутні.

Стандартним елективним середовищем для культивування *Lactobacillus* spp. є середовище MRS (de Man-Rogosa-Sharpe) [7] наступного складу (г/л):

декстроза	20,0
білковий гідролізат	10,0
пептон ферментативний або м'ясний екстракт	10,0
екстракт харчових дріжджів	5,0
натрій лимоннокислий	5,0
K ₂ HPO ₄	2,0
цитрат амонію	2,0
Tween® 80	1,0
MgSO ₄ •7H ₂ O	0,1
MnSO ₄ •4H ₂ O	0,05
агар мікробіологічний	15,0.

Tween® 80, цитрат та ацетат стимулюють ріст лактобактерій; MgSO₄•7H₂O та MnSO₄•7H₂O необхідні для росту в присутності цитрату. Відоме індикаторне бактеріологічне середовище для виділення штамів *Oxalobacter formigenes* наступного складу [8] (г/л):

K ₂ HPO ₄	0,25
---------------------------------	------

натрію ацетат	0,082
екстракт дріжджів	0,5
$\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$	1,0
Амонію оксалат	5,68
Na_2CO_3	4,0
$\text{cystein} \times \text{HCl} \times \text{H}_2\text{O}$	0,33
$\text{Na}_2\text{S} \times 9\text{H}_2\text{O}$	0,33
агар	22
вода	решта.

Кальцію хлорид та амонію оксалат утворюють нерозчинний преципітат оксалату кальцію (в реакції $\text{CaCl}_2 + (\text{NH}_4)_2\text{C}_2\text{O}_4 \gg \text{CaC}_2\text{O}_4 + 2\text{NH}_4\text{Cl}$), що робить середовище непрозорим. При культивуванні мікроорганізмів, здатних до деградації оксалату, навколо них формується зона прозорого середовища, що не містить кальцію оксалату.

- 5 Наявність в складі середовища кальцію хлориду, амонію ацетату, K_2HPO_4 , цитрату, дріжджового екстракту та агару є спільними з суттєвими ознаками рішенням, що заявляється.

До причин, що заважають отриманню бажаного технічного результату можна віднести той факт, що склад середовища не є оптимальним для представників *Lactobacillus* spp. Оскільки здатність до деградації оксалатів у лактобактерій є індукційною ознакою (тобто вимагає певних умов для активації цього метаболічного шляху, на відміну від *Oxalobacter formigenes*, для якого оксалати є єдиним доступним субстратом), умови культивування (зокрема відсутність іонів Mn^{2+} [9]), мають суттєвий вплив на можливість досягнення технічного результату. Власно, за формальними ознаками, це середовище не може вважатися аналогом корисної моделі, що заявляється, оскільки не призначене для культивування лактобактерій.

- 10 15 В основу корисної моделі поставлено задачу розробити поживне середовище для виділення лактобактерій, здатних до деградації оксалатів, в якому за рахунок введення індикаторної системи до стандартного середовища MRS, забезпечити можливість візуальної детекції бажаного виду метаболічної активності у представників *Lactobacillus* spp...

Поставлена задача вирішується наступним складом середовища (г/л):

декстроза	20,0
білковий гідролізат	10,0
пептон ферментативний	10,0
екстракт харчових дріжджів	5,0
натрій лимоннокислий	5,0
K_2HPO_4	2,0
цитрат амонію	2,0
Tween® 80	1,0
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,1
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0,1
$\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$	1,0
амонію оксалат	5,68
агар мікробіологічний	15,0
вода	(pH 5,5) решта.

- 20 Вміст хлориду кальцію та амонію оксалату визначається оптимальними параметрами утворення кальцію оксалату та можливостями його деградації тест-штамом з формуванням зони просвітлення протягом 48 годин інкубації культури. Зміна співвідношення цих компонентів призводить до небажаного накопичення надлишків хлориду кальцію, або оксалату амонію. Збільшення або зменшення концентрації кінцевого продукту реакції (оксалату кальцію) негативно впливає на можливості візуальної оцінки бажаного виду метаболічної активності.

- 25 Двократне збільшення кількості сульфату марганцю (порівняно з його вмістом в MRS) сприяють підвищенню рівня експресії *Oxc* та *Frc* [9] та стимуляції бажаного виду метаболічної активності. Подальше підвищення концентрації MnSO_4 негативно впливає на ростові властивості середовища.

- 30 За даними літератури [10] рівень транскрипції *Oxc* та *Frc* при pH вищий ніж 5.5 є незначним та суттєво підвищується в діапазоні 5,5-4,5. В процесі культивування лактобактерій кислотність середовища зростає і оптимальний діапазон (pH 5,5-4,5) досягається протягом перших 24-36 годин культивування.

- 35 Наведені нижче дані підтверджують, що розроблена модифікації MRS забезпечує цілком оптимальні умови росту для різних видів лактобактерій (Табл.1).

Таблиця 1

Порівняльні данні ростових властивостей стандартного та сконструйованого середовища

Тест-штами	MRS		Розроблене середовище	
	Розведення культури			
	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷
	Кількість мікроорганізмів (КУО) в 0,1 мл (M±m)			
L.gasseri ATCC 33323	68,4±0,7	6,7±0,2	65,1±0,5	6,4±0,3
L.plantarum 8P-A3	73,4±0,5	7,3±0,2	69,6±0,6	6,9±0,1
L.acidophilus R0052	70,9±0,8	7,1±0,3	67,8±0,7	6,7±0,2
L.rhamnosus R0011	71,6±0,8	7,1±0,3	69,8±0,7	6,9±0,2

Можливість здійснення корисної моделі підтверджено експериментальними даними, отриманими при використанні розробленого середовища для оцінки здатності до деградації оксалатів різними, (здебільшого доступними в складі комерційних пробіотичних препаратів) штамми лактобактерій (креслення).

Креслення. Результати дослідження здатності до деградації оксалатів методом агарової дифузії (метод "колодязів"). Навколо лунок 1, 2 та 8, що містять культури L. plantarum 299v, L. plantarum wt та L.gasseri ATCC 33323, відповідно, спостерігається виражена зона просвітлення культурального середовища.

Нумерація штамів та інформація щодо їх походження наведені в таблиці 2.

Таблиця 2

Перелік та походження застосованих штамів

№ п/п Тест-штам	Походження
1. L. plantarum 299v	пробіотичний препарат "ProbiMage"; Bringwell Швеція
2. L. plantarum wt	виділений авторами КМ з фекальної мікрофлори здорової людини
3. L. plantarum 8P-A3	пробіотичний препарат "Лактонорм-Плюс"; "Авицена", Україна
4. L. acidophilus	пробіотичний препарат "L.Acidophilus (60)" / Лактобактерии лиофилизир; Santegra, США
5. L. acidophilus R0052	пробіотичний препарат "Lacidofil"; Institut Rosell Inc., Канада
6. L. rhamnosus R0011	пробіотичний препарат "Lacidofil"; Institut Rosell Inc., Канада
7. L reuteri DSM17938	пробіотичний препарат "Lactobacillus reuteri Protectis" Швеція BioGaia
8. Lgasseri ATCC 33323	LGC's partnership with ATCC: http://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/33323.aspx

Як позитивний контроль використано референтний штам Lactobacillus gasseri ATCC 33323 (раніше відомий як "F. Gasser 63 AM") з встановленою здатністю до деградації оксалатів [11].

ПЕРЕЛІК ПОСИЛАНЬ

1. Hatch M. Intestinal excretion of oxalate in chronic renal failure / Hatch M., Freel RW, Vaziri ND... // J Am Soc Nephrol-1994. - V 5. - N 6. - P. 1339-1343.

2. Lange, J.N. Sensitivity of Human Strains of Oxalobacter formigenes to Commonly Prescribed Antibiotics. Lange, J.N., Wood KD, Wong H, et al. // Urology. -2012. -V79. -N6. -P.1286-1289. doi: 10.1016/j.urology.2011.11.017.

3. Kaufman, D.W. Oxalobacter formigenes May Reduce the Risk of Calcium Oxalate Kidney Stones. Kaufman DW, Kelly JP, Curhan GC, et al. //Journal of the American Society of Nephrology: JASN. 2008;19(6):1197-1203. doi:10.1681/ASN.2007101058.

4. Abratt, V.R. Oxalate-degrading bacteria of the human gut as probiotics in the management of kidney stone disease. Abratt V.R., Reid S.J. //Adv Appl Microbiol. - 2010. - V72. - P. 63-87. doi: 10.1016/S0065-2164(10)72003-7.

5. Hoppe, B. Oxalobacter formigenes: a potential tool for the treatment of primary hyperoxaluria type 1. Hoppe B., Beck B., Gatter N., von Unruh G., Tischler A., Hesse A., Laube N., Kaul P., Sidhu H...//Kidney Int.-2006.-V70.-N7.-P. 1305-1311.

6. Azcarate-Peril, M.A. Analysis of the Genome Sequence of Lactobacillus gasseri ATCC 33323 Reveals the Molecular Basis of an Autochthonous Intestinal Organism. Azcarate-Peril MA, Altermann

E, Goh YJ, et al. //Applied and Environmental Microbiology. - 2008. - V74. - N15. -P. 4610-4625. doi:10.1128/AEM.00054-08.

7. LACTOBACILLI MRS AGAR [Електронний ресурс] - Режим доступу до ресурсу: https://catalog.hardydiagnostics.com/cp_prod/Content/hugo/LactobacilliMRSAgar.html

5 8. Milton, J. A. *Oxalobacter formigenes* gen. nov., sp. nov.: oxalate-degrading anaerobes that inhabit the gastrointestinal tract. Milton J. Allison, Karl A. Dawson, William R. Mayberry, John G. Foss// Archives of Microbiology. -1985. - V 141. - N1. - P. 1-7.

9. Tanner, A. Oxalate decarboxylase requires manganese and dioxygen for activity. Overexpression and characterization of *Bacillus subtilis* YvrK and YoaN. Tanner A., Bowater L., Fairhurst S.A., Bornemann S. //J Biol Chem. - 2001. - V 276. - N47. - P.43627-43634.

10 10. Turroni, S. Oxalate-Degrading Activity in *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*: Impact of Acidic Conditions on the Transcriptional Levels of the Oxalyl Coenzyme A (CoA) Decarboxylase and Formyl-CoA Transferase Genes. Turroni S., C. Bendazzoli, S.C. F. Dipalo et al. //Appl. Environ. Microbiol. - 2010. - vol. 76. -N 16. -P. 5609-5620.

15 11.Lauer, E. *Lactobacillus gasserii* sp. nov., a new species of the subgenus *Thermobacterium*. Lauer, E., and O. Kandler. //Zentralblatt für Bakteriologie: I. Abt. Originale C: Allgemeine, angewandte und ökologische Mikrobiologie. - 1980. - V 1. - N 1. - P.75-78.

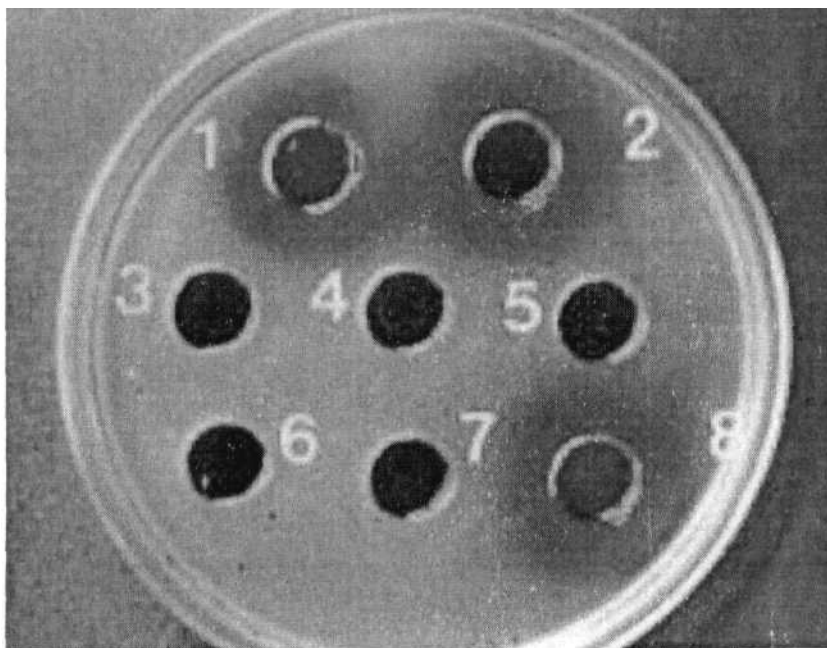
ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

20

Поживне середовище для виділення лактобактерій, здатних до деградації оксалатів, що містить декстрозу, білковий гідролізат, пептон ферментативний, екстракт харчових дріжджів, натрій лимоннокислий, цитрат амонію, K_2HPO_4 , Tween®80, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, $MnSO_4 \cdot 4H_2O$, агар мікробіологічний, яке **відрізняється** тим, що додатково містить хлорид кальцію та амонію оксалат при наступному співвідношенні компонентів (г/л):

25

декстроза	20,0
білковий гідролізат	10,0
пептон ферментативний	10,0
екстракт харчових дріжджів	5,0
натрій лимоннокислий	5,0
K_2HPO_4	2,0
цитрат амонію	2,0
Tween ® 80	1,0
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,1
$MnSO_4 \cdot 4H_2O$	0,1
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	1,0
амонію оксалат	5,68
агар мікробіологічний	15,0
	(pH 5,5)
вода	решта.



Комп'ютерна верстка Л. Литвиненко

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Василя Липківського, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

ДП "Український інститут інтелектуальної власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601