



ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

УКРАЇНА

(19) UA

(11) 115978

(13) U

(51) МПК

A61K 35/74 (2015.01)

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: **u 2016 07932**

(22) Дата подання заявки: **18.07.2016**

(24) Дата, з якої є чинними
права на корисну
модель: **10.05.2017**

(46) Публікація відомостей
про видачу патенту: **10.05.2017, Бюл.№ 9**

(72) Винахідник(и):

**Шмараков Ігор Олександрович (UA),
Борщовецька Віра Леонідівна (UA),
Марченко Михайло Маркович (UA)**

(73) Власник(и):

**ЧЕРНІВЕЦЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ
УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ ЮРІЯ ФЕДЬКОВИЧА,
вул. Коцюбинського, 2, м. Чернівці, 58012
(UA)**

(54) СПОСІБ ПРОБІОТИЧНОЇ ПРЕВЕНТИВНОЇ КОРЕКЦІЇ БІСФЕНОЛ-А-ІНДУКОВАНОГО ТОКСИЧНОГО УРАЖЕННЯ ПЕЧІНКИ

(57) Реферат:

Спосіб пробіотичної превентивної корекції бісфенол-А-індукованого токсичного ураження печінки включає введення пробіотичних культур *Lactobacillus* з метою колонізації кишечника цими бактеріями та залученням їх у процеси метаболізму ксенобіотиків. Корекція проводиться селективною пробіотичною аутохтонною культурою бактерій даного виду, яку виділено з фекальних зразків тварин, що контактували із ксенобіотиком, у дозі $3 \cdot 10^7$ КУО протягом 4 діб.

UA 115978 U

Спосіб належить до медичної біохімії, мікробіології та біотехнології і може бути використаний для попередження токсичного ураження печінки, індукованого введенням ксенобіотиками.

Постійний побутовий контакт людини із ксенобіотиками (чужорідні для організму сполуки, які не є пластичним та енергетичним субстратом) виступає одним із основних етіологічних факторів, що призводять до розвитку процесів гепатоксичності. В аспекті інструментів-модуляторів токсичного ураження печінки на сьогодні надзвичайної актуальності набули пробіотики (живі мікроорганізми та речовини мікробного походження, які при введенні в організм природним шляхом та в дозволений кількості чинять позитивний ефект на організм господаря). Зокрема пробіотики використовуються при етанол - (Alcoholic Liver Disease: A Mouse Model Reveals Protection by *Lactobacillus fermentum* IR. Barone, F. Rappa, F. Macaluso [et al.] // *Clinical Translational Gastroenterology*. - 2016. - Vol. 21, № 7. - P. 1-13.), CCl₄ - (Kumar P. Potential Probiotic *Escherichia coli* 16 Harboring the Vitreoscilla Hemoglobin Gene Improves Gastrointestinal Tract Colonization and Ameliorates Carbon Tetrachloride Induced Hepatotoxicity in Rats / P. Kumar, A. V. Ranawade, N. G. Kumar // *BioMed Research International*. - 2014. - Vol. 2014. -P. 1-9.), ацетамінофен - (Probiotic *Enterococcus lactis* ITRHR1 protects against acetaminophen-induced hepatotoxicity / S. Sharma, J. Chaturvedi, B. P. Chaudhari [et al.] // *Nutrition*. - 2012. - Vol. 28, № 2. P. 173-181), D-галактозамін - (Endotoxin-and D-galactosamine-induced liver injury improved by the administration of *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* and blueberry / N. Osman, D. Adawi, S. Ahrne [et al.] // *Digestive and Liver Disease*. - 2007. - Vol. 39, № 9. - P. 849-856.), та флутамід- (*Saccharomyces cerevisiae* intervention for relieving flutamide-induced hepatotoxicity in male rats / F. Mannaa, H. H. Ahmed, S. F. Estefan [et al.] // *Pharmazie*. - 2005. - Vol. 60, № 9. - P. 689-695.) індукованих токсичних ураженнях печінки. Проте виробництво та довготривале використання специфічних пробіотиків є досить дорогим. У зв'язку з цим виникає потреба пошуку альтернативних способів отримання активних пробіотичних штамів, використання яких забезпечувало б корекцію токсичного ураження печінки, а спосіб їх отримання дозволив б зменшити собівартість технології отримання пробіотиків.

Найближчим аналогом є спосіб корекції алкогольної інтоксикації шляхом введення культури роду *Lactobacillus* (*Lactobacillus rhamnosus* GG culture supernatant ameliorates acute alcohol-induced intestinal permeability and liver injury / Y. Wang, Y. Liu, A. Sidhu // *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver. Physiol.* 2012. Vol. 303, № 1. P. 32-41.). При застосуванні даного підходу, який полягав у одноразовому введенні протягом 5 діб лактобактерії (10^9 КУО) фіксувалося зниження аланінамінотрансферазної активності у сироватці крові та мієлопероксидазної активності в паренхімі печінки при алкогольній інтоксикації.

Однак недоліками найближчого аналогу є використання готової пробіотичної культури, яка не є компонентом аутомікрофлори. Автохтонні облігатні та алохтонні факультативні мікроорганізми власної мікрофлори можуть виявляти колонізаційну резистентність стосовно пробіотика. За рахунок цього виживання та приживання пробіотичних штамів дуже часто є низькими. Крім того до недоліків даного способу належить висока собівартість даного пробіотика.

В основу корисної моделі поставлена задача застосування пробіотиків, виділених із фекального біоптату, з метою колонізації кишечника здорових тварин бактеріями, дозволить попередити розвиток токсичного ураження печінки та при цьому дасть можливість значно знизити собівартість способу отримання пробіотичних штамів.

Поставлена задача вирішується тим, що спосіб превентивної корекції бісфенол-А-індукованого токсичного ураження печінки пробіотичними мікроорганізмами, виділених із фекального біоптату тварин, які зазнавали токсичного ураження печінки, при введенні бісфенолу-А. Згідно з корисною моделлю превентивну корекцію бісфенол-А-індукованого токсичного ураження печінки проводять шляхом попереднього введення селективної пробіотичної аутохтонної культури бактерій роду *Lactobacillus*, виділеної із фекальних зразків тварин, що контактували із ксенобіотиком, у дозі $3 \cdot 10^7$ КУО протягом 4 діб. Заявлений спосіб включає попереднє щоденне введення протягом 4 діб високоактивної щодо детоксикації визначеного ксенобіотика, селективної культури бактерій роду *Lactobacillus* з метою колонізації цими пробіотиками кишечника тварин у дозі $3 \cdot 10^7$ КУО, що дозволяє попередити розвиток бісфенол-А-індукованого токсичного ураження.

На фіг. 1 наведена схема отримання селективної пробіотичної культури та її застосування з метою корекції токсичного ураження печінки.

На фіг. 2 наведені маркери токсичного ураження та запалення паренхіми печінки: А- аланінамінотрансферазна активність у сироватці крові, Б - мієлопероксидазна активність у

тканині печінки, величини позначені різними буквеними індексами (a, b, c) статистично достовірно відрізняються, $P < 0,05$.

На фіг. 3 наведена кількісна оцінка оксидативного гепатотоксичного пошкодження ліпідів та протеїнів печінки: А - ТБК-активні продукти, Б - протеїнові карбонільні групи, В - протеїнові SH-групи, величини, позначені різними буквеними індексами (a, b, c), статистично достовірно відрізняються, $P < 0,05$.

При здійсненні способу вдається попередити розвиток токсичного ураження печінки, індукованого введенням бісфенолу-А, шляхом попереднього введення високоактивної щодо детоксикації даного ксенобіотика, селективної культури бактерій роду *Lactobacillus* (Фіг. 1.).

Приклад.

Спосіб здійснюють наступним чином. На першому етапі проводять індукцію токсичного ураження печінки *in vivo* шляхом введення *per os* 50 мг/кг біс фенолу-А (BPA), що відповідає дозі LOAEL - найнижчій дозі, при якій спостерігається несприятливий ефект (від англ. Lowest observable adverse effect level) (National Toxicology Program U.S. Department of Health and Human Services. Center For The Evaluation of Risks To Human Reproduction; NTP-CERHR Monograph on the Potential Human Reproductive and Developmental Effects of Bisphenol A.: NIH Publication, 2008. 599 p.). Із фекального біоптату даних тварин виділяють селективну культуру бактерій роду *Lactobacillus* шляхом висіву в умовах ламінар-боксу 0,1 мл серійних розведень фекального біоптату на селективне для лактобактерій середовище - MRS Agar (HIMEDIA, Індія). Лактобацили інкубують анаеробно при 37 ± 2 °C протягом 48 ± 2 годин. Після інкубації проводять збирання культури та розведення її у 1 мл стерильного фізіологічного розчину.

На наступному етапі здоровим тваринам вводять отриману селективну культуру *per os* в кількості $3 \cdot 10^7$ КУО щоденно протягом 4 діб для колонізації кишечника даними мікроорганізмами. Пероральне введення даним тваринам 50 мг/кг бісфенолу-А з метою індукції токсичного ураження печінки не призводило до розвитку процесів гепатотоксичності (фіг. 1).

Для порівняння використовували корегуючу дію пробіотиків, виділених із фекального біоптату тварин, які не контактували із ксенобіотиком.

Оцінку пробіотичної корекції токсичного ураження печінки проводили на основі аналізу компонентного складу мікробіоти кишечника (кількісне визначення бактерій родів *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* та *E.coli*), визначення аланінамінотрансферазної активності у сироватці крові (ALT, як маркера некрозу гепатоцитів), мієлопероксидазної активності (МРО) в тканині печінки, як показника запальної інфільтрації тканини печінки, продукти оксидативного пошкодження клітинних біомолекул у тканині печінки: ТБК-активні продукти (ТБКАП) як показник пошкодження ліпідів, протеїнові карбонільні групи, протеїнові та непротеїнові SH-групи як показники пошкодження протеїнів.

Результатами наших досліджень встановлено, що у тварин, які не отримували пробіотиків, введення бісфенолу-А призводить до розвитку дисбіотичних змін кишечника (кількість біфідо - $4,1 \text{ Ig КУО/г}$, лактобактерій - $4,29 \text{ Ig КУО/г}$ та *E. coli*. - $3,90 \text{ Ig КУО/г}$), зростання ALT активність у сироватці крові ($8,48 \pm 1,27 \text{ МО/л}$) та МРО активності у тканині печінки ($0,012 \pm 0,002 \Delta\text{D/хв./мг}$ протешу), оксидативного пошкодження ліпідних та протеїнових компонентів печінки (вміст ТБКАП - 1634 ± 171 , карбонільних груп - $1430 \pm 148 \text{ нмоль/мг}$ протеїну, протеїнових SH-груп - $22243 \pm 1971 \text{ нмоль/мг}$ протеїну).

Введення пробіотиків, виділених із фекального біоптату тварин, що не контактували із ксенобіотиком на фоні введення бісфенолу-А супроводжувалось розвитком процесів гепатотоксичності (Фіг. 2, 3.). Водночас попередня колонізація селективними пробіотиками забезпечувала попередження розвитку BPA-індукованого токсичного ураження печінки. Зокрема, зафіксована нормалізація аутомікрофлори кишечника (збільшення кількості біфідо- ($4,53 \text{ Ig КУО/г}$) та лактобактерій ($4,77 \text{ Ig КУО/г}$), та зниження кількості *E. coli*. ($2,90 \text{ Ig КУО/г}$)). Водночас фіксувався низький рівень ALT активності у сироватці крові ($4,34 \pm 0,77 \text{ МО/л}$) та МРО активності у тканині печінки ($0,002 \pm 0,001 \Delta\text{D/хв./мг}$ протеїну), вміст продуктів оксидативного пошкодження ліпідних та протеїнових компонентів печінки (вміст ТБКАП - 1220 ± 209 , карбонільних груп - $594 \pm 83 \text{ нмоль/мг}$ протеїну, протеїнових SH-груп - $10301 \pm 5907 \text{ нмоль/мг}$ протеїну).

Отже, застосування підходу виділення селективної аутохтонної пробіотичної культури тварин, що піддавались контакту із ксенобіотиком та її подальше введення здоровим тваринам, забезпечує попередження токсичного ураження печінки, індуковане введенням бісфенолу-А.

Джерела інформації:

1. Alcoholic Liver Disease: A Mouse Model Reveals Protection by *Lactobacillus fermentum* I R. Barone, F. Rappa, F. Macaluso [et al.] // Clinical Translational Gastroenterology. - 2016. - Vol. 21, № 7. - P. 1-13.

2. Endotoxin-and D-galactosamine-induced liver injury improved by the administration of *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* and blueberry / N. Osman, D. Adawi, S. Ahrne [et al.] // *Digestive and Liver Disease*. - 2007. - Vol. 39, № 9. -P. 849-856.

5 3. Kumar P. Potential Probiotic *Escherichia coli* 16 Harboring the *Vitreoscilla* Hemoglobin Gene Improves Gastrointestinal Tract Colonization and Ameliorates Carbon Tetrachloride Induced Hepatotoxicity in Rats / P. Kumar, A. V. Ranawade, N. G. Kumar // *BioMed Research International*. - 2014. - Vol. 2014.-P. 1-9.

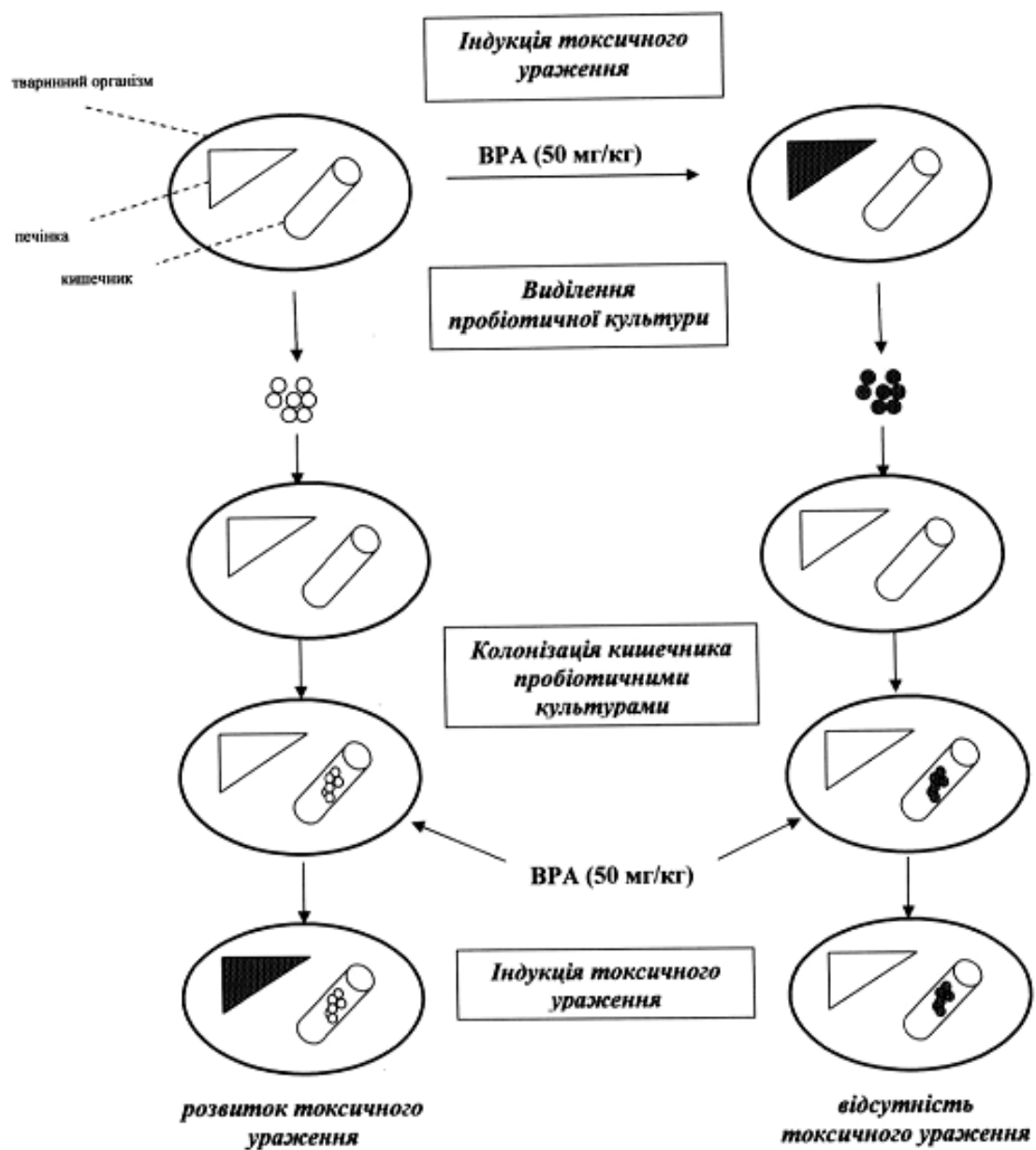
10 4. National Toxicology Program U.S. Department of Health and Human Services. Center For The Evaluation of Risks To Human Reproduction; NTP-CERHR Monograph on the Potential Human Reproductive and Developmental Effects of Bisphenol A.: NIH Publication, 2008. 599 p.

5. Probiotic *Enterococcus lactis* IITRHR1 protects against acetaminophen-induced hepatotoxicity / S. Sharma, J. Chaturvedi, B. P. Chaudhari [et al.] // *Nutrition*. -2012.-Vol. 28, №2.-P. 173-181.

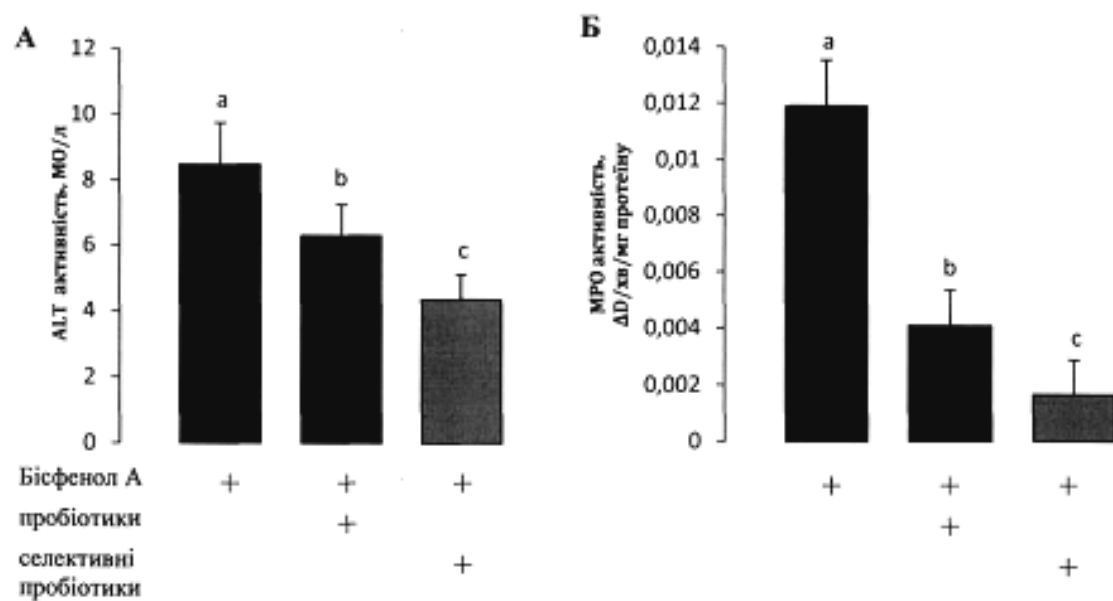
15 6. *Saccharomyces cerevisiae* intervention for relieving flutamide-induced hepatotoxicity in male rats / F. Manna, H. H. Ahmed, S. F. Estefan [et al.] // *Pharmazie*. - 2005. - Vol. 60, № 9. - P. 689-695.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

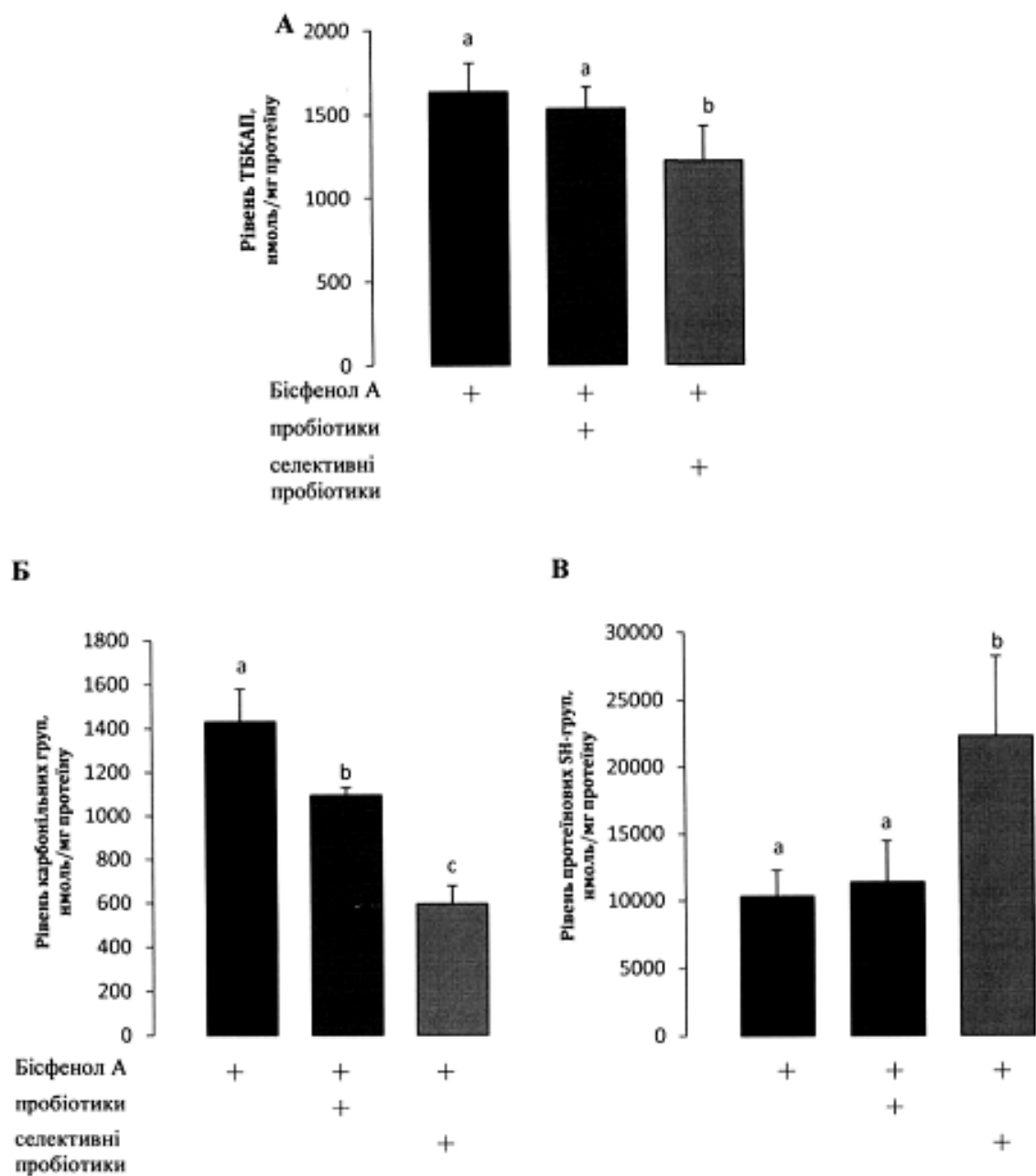
20 Спосіб пробіотичної превентивної корекції бісфенол-А-індукованого токсичного ураження печінки, що включає введення пробіотичних культур *Lactobacillus* з метою колонізації кишечника цими бактеріями та залученням їх у процеси метаболізму ксенобіотиків, який **відрізняється** тим, що корекція проводиться селективною пробіотичною аутохтонною культурою бактерій даного виду, яку виділено з фекальних зразків тварин, що контактували із ксенобіотиком, у дозі $3 \cdot 10^7$ КУО протягом 4 діб.



Фіг. 1



Фіг. 2



Фіг. 3

Комп'ютерна верстка Л. Ціхановська

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