

ПОКАЗНИКИ ЖИТТЄЗДАТНОСТІ ТА БІОЛОГІЧНІ ВЛАСТИВОСТІ МУЗЕЙНИХ ШТАМІВ КЛЕБСІЄЛ, ЩО ТРИВАЛИЙ ЧАС ЗБЕРІГАЛИСЬ У ЛІОФІЛІЗОВАНОМУ СТАНІ

¹Перетятко О.Г., ¹Ягнюк Ю.А., ¹Скляр Н.І., ¹Крестецька С.Л., ²Гуріна Т.М.,
³Тіщенко І.Ю., ⁴Большакова Г.М., ¹Холодна Т.В.

¹ДУ «Інститут мікробіології та імунології ім. І.І. Мечникова
Національної академії медичних наук України», м. Харків, Україна

²Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, м. Харків, Україна

³Національний фармацевтичний університет, м. Харків, Україна

⁴Навчально-науковий медичний інститут НТУ «ХПІ» МОН України,
м. Харків, Україна

lazamimus@ukr.net

Вступ. Необхідною умовою підтримання колекцій мікроорганізмів є забезпечення довготривалого збереження штамів у функціонально повноцінному стані без змін їх фено- та генотипу. Стабільність біологічних властивостей колекційних штамів мікроорганізмів обумовлює можливість їх цільового використання у різних галузях біотехнології та медицини. Вже більш ніж століття для зберігання мікроорганізмів використовується спосіб сублімаційного висушування, при якому вода з клітин випаровується в умовах вакууму, що дозволяє повністю зберегти первинну структуру об'єкта консервування. Однак в процесі ліофілізації та подальшого довгострокового зберігання бактерії піддаються стресовим факторам, що можуть вплинути як на виживання мікроорганізмів, так і на їх біологічні властивості.

Метою дослідження було проведення перевірки життєздатності та фізіолого-біохімічних властивостей штамів, які тривалий час зберігались у ліофілізованому стані у колекції Музею мікроорганізмів ДУ «Інститут мікробіології та імунології ім. І.І. Мечникова Національної академії медичних наук України».

Матеріали та методи. Об'єктами дослідження були 7 штамів *Klebsiella* spp., вилучених у період з 1939 по 1960 роки у різних країнах світу – 4 штама вилучено на території України, один штам надійшов до колекції Музею з фонду національної колекції типових культур (NCTC, Лондон), один штам – з Інституту стандартизації і контролю ім. Л.А. Тарасевича, Москва, місце виділення одного штаму, що надійшов до колекції у 1946 році з академії медичних наук СРСР, невідоме. Ліофілізовані зразки зберігались у колекції від 21 до 69 років.

Ліофілізовані культури відновлювали шляхом розчинення вмісту ампули 1,0 мл поживного бульйону та висіву мікробної суспензії з десятикратних розведень на агаризовані середовища (кров'яний агар, середовище Ендо); життєздатність визначали шляхом підрахунку кількості колонієутворюючих одиниць (КУО/мл). При оцінці показників виживання колекційних бактеріальних культур враховувалося, що для виготовлення ліофілізованих

зразків зазвичай використовують суспензії біоматеріалу з вмістом мікроорганізмів не менш ніж 10^9 КУО/мл. Реідентифікацію мікробних культур проводили з використанням API системи виробництва «Bio-Merieux», Франція (ID 32 GN – для ідентифікації ентеробактерій). Приготування суспензій мікроорганізмів із визначеною концентрацією мікробних клітин проводили за шкалою McFarland з використанням електронного приладу Densi-La-Meter (PLIVA-Lachema Diagnostika, Чеська Республіка). Статистичну обробку отриманих даних проводили за допомогою методів непараметричної статистики з використанням комп'ютерних програм Microsoft Excel 2007, STATISTICA 6.0.

Результати та їх обговорення. Було встановлено, що усі взяті у досліді зразки виявилися життєздатними, кількість колонієутворюючих одиниць знаходилася у діапазоні від 10^3 до 10^9 КУО/мл, показники виживання штамів варіювали від 0,1 % до 100,0 %, середній показник виживання складав $(35,2 \pm 19,5)$ %. Вивчення морфологічних та тинкторіальних властивостей відновлених штамів *Klebsiella* spp. показало, що мікробні клітини мали паличкоподібну форму, за Грамом фарбувались негативно, в мазках розташовувались поодинокі, парно або групами. Ріст мікроорганізмів у рідких поживних середовищах (м'ясо-пептонний бульйон) характеризувався дифузним помутнінням, що супроводжувалось утворенням слабо вираженого осаду на дні пробірки та ніжної плівки на поверхні бульйону на другу добу культивування. На середовищі Ендо усі штами утворювали червоні або малинові колонії М-форми, 57,1 % досліджених штамів при рості на кров'яному агарі характеризувались гемолітичним фенотипом. Кореляційної залежності між кількістю КУО та терміном зберігання зразка не виявлено ($r = 0$). Так, у штаму *K. rhinoscleromatis* 46 (05003), 1955 року ліофілізації, показник виживання дорівнював 100 %, тоді як у штаму *K. pneumoniae* 5055 (05006), ліофілізованого у 2003 році – 0,1 %. При аналізі результатів проведеної реідентифікації клебсієл було виявлено деякі відмінності від заявлених паспортних даних штамів. Так, штам, заявлений як *K. pneumoniae* 1298 (05005) за результатами реідентифікації відповідав біохімічному профілю *Escherichia coli*, а штам *K. pneumoniae* 34 (05004) – *Erwinia* spp.

Таким чином, за результатами проведених досліджень по відновленню ліофілізованих музейних штамів *Klebsiella* spp. встановлена життєздатність усіх взятих у досліді зразків, показники виживання залежали не від терміну зберігання зразків, а, вочевидь, від якості ліофілізації. Виявлені нами розбіжності у таксономічній приналежності досліджуваних штамів після їх реідентифікації можуть бути пов'язані з тим, що в середині минулого століття, у роки виділення досліджуваних штамів, критерії біохімічної ідентифікації клебсієл відрізнялись від положень сучасної мікробіологічної систематики. Крім того, до публікації у 1980 році першого видання «Затверджених списків назв бактерій» (Skerman, V. B. D., McGowan, V., Sneath, P. H. A. Approved lists of bacterial names. Int J Syst Bacteriol. 1980. No 30. P. 225–420) одні й ті ж самі мікроорганізми могли мати різні найменування.

Висновки. 1. Результати проведених досліджень підтвердили ефективність ліофілізації, як способу довготривалого (понад 60 років) зберігання штамів мікроорганізмів у функціонально повноцінному стані без зміни тинкторіальних та культуральних властивостей. 2. При проведенні реідентифікації у двох штамів, заявлених як *K. pneumoniae*, виявлено невідповідність біохімічному профілю роду *Klebsiella*. З урахуванням отриманих даних було внесено корективи у паспорти штамів.

ВПЛИВ УТВОРЕННЯ ДОМІШОК ДОКСИЦИКЛІНУ У СКЛАДІ НАШКІРНОЇ ПІНИ НА ЯКІСТЬ ЛІКАРСЬКОГО ЗАСОБУ

Попова М.Е., Салій О.О., Страшний В.В.

Київський університет технологій та дизайну, Київ, Україна

popova.me@knutd.edu.ua

Вступ. Доксидиклін належить до класу антибіотиків тетрациклінового ряду, і при зберіганні його розчинів можуть утворюватися характерні домішки. Специфікованими домішками доксидикліну є 4-епідоксидиклін, 6-епідоксидиклін, метациклін, 4-епі-6-епідоксидиклін, окситетрациклін та 2-ацетил-2-декарбамоїлдоксицилін.

4-епідоксидиклін – це епімер доксидикліну, який відрізняється конфігурацією біля четвертого атома вуглецю, тоді як 6-епідоксидиклін - це епімер, пов'язаний зі зміною конфігурації в шостому положенні молекули. Метациклін – це дегідратований аналог доксидикліну (також відомий як 6-метиленовий аналог), який утворюється внаслідок втрати елемента води з його структури.

Державна фармакопея України встановлює максимально допустимий вміст 6-епідоксидикліну та метацикліну до 2%, тоді як інші специфіковані домішки не повинні перевищувати 0,5%.

Результати та їх обговорення. Водні розчини доксидикліну схильні до деградації під впливом температури, світла та рН середовища. За механізмами утворення, домішки поділяються на утворені шляхом епімеризації, дегідратації, впливу світла та термічного розкладання.

Тетрациклінові антибіотики схильні до епімеризації – процесу, при якому змінюється просторова конфігурація хімічних центрів, особливо в кислому середовищі. Доксидиклін може епімеризуватися в положенні С4, утворюючи 4-епідоксидиклін. Епімеризація в положенні С4 є оборотним процесом, який прискорюється при рН ~ 3-5. Аналогічно, за несприятливих умов епімеризація може відбуватися за положенням С6, що призводить до утворення 6-епідоксидикліну. Епімери доксидикліну мають однакову молекулярну формулу, але різну просторову конфігурацію, що часто призводить до зниження або втрати антибіотичної активності.