

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ОБОСНОВАНИЕ РАЗРАБОТКИ И КОНСТРУИРОВАНИЯ НОВОГО БИОГЕПАТОПРОТЕКТОРА

© 2019 г. Н. А. Забокрицкий

E-mail: pharmusma@rambler.ru

ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии» Уральского отделения Российской академии образования, Екатеринбург, Россия

Поступила: 23.05.2019. Принята: 28.06.2019

В работе приведены результаты доклинических исследований по выбору микроорганизмов для конструирования комплексного пробиотического препарата с выраженным гепатопротекторным действием. Экспериментально установлено, что наибольшую антагонистическую активность в отношении патогенных и условно-патогенных микроорганизмов проявили пробиотические штаммы *Bacillus subtilis* B-2335, B-4759, B-9906. Получены экспериментальные данные, что штаммы *Bacillus subtilis* B-9906, *Bacillus subtilis* B-4759 обладали способностью продуцировать протеолитические и амилаолитические ферменты не только сравнительно в более высоких концентрациях, но и на более ранние сроки культивирования;. Установлено, что наиболее перспективными штаммами для конструирования комбинированного биогепаатопротектора являются три штамма: *Bacillus subtilis* B-2335, B-4759, B-9906.

**Ключевые слова:** пробиотик, штаммы *Bacillus subtilis*, конструирование

DOI: 10.31857/S102872210007244-3

**Адрес:** Екатеринбург, ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии» Уральского отделения Российской академии наук, Забокрицкий Николай Александрович.

Тел.: +73433740070, E-mail: pharmusma@rambler.ru

**Автор:**

**Забокрицкий Н. А.**, д.м.н., доцент, старший научный сотрудник лаборатории иммунофизиологии и иммунофармакологии ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии» Уральского отделения Российской академии образования, Екатеринбург, Россия.

### ВВЕДЕНИЕ

Согласно современным представлениям, гепатопротекторные препараты для лечения токсических поражений печени должны обладать следующими свойствами:

- хорошей всасываемостью в желудочно-кишечном тракте;
- эффектом “первого прохождения” через печень;
- способностью к естественному метаболизму при имеющейся патологии печени;
- энтерогепатической циркуляцией и способностью предупреждать образование высокоактивных повреждающих соединений или способностью связывать такие соединения;

- противовоспалительными и иммуномодулирующими свойствами;
- способностью подавлять фиброгенез; а также стимулировать регенеративные и репаративные процессы в печени;
- отсутствием токсичности.

К сожалению, на сегодняшний день ни один из использующихся в медицинской практике гепатопротекторов не удовлетворяет в полной мере этим требованиям, хотя в последние годы арсенал современных гепатозащитных средств расширился за счёт появления как синтетических препаратов, так и новых природных (в основном растительного происхождения) средств.

В настоящее время при лечении токсических поражений печени важная роль отводится патогенетической терапии, которая направлена на коррекцию факторов, играющих существенную роль в механизмах повреждения паренхимы печени.

В комплексном лечении токсических поражений печени применяют и такую фармакологическую группу препаратов, которые обладают избирательным защитным действием в отношении печени — это так называемые гепатопротекторы.

текторы. Их системное действие направлено на восстановление гомеостаза в органе, повышение устойчивости гепатоцитов к воздействию патогенных факторов, нормализацию функциональной активности и стимуляцию репаративно-регенерационных процессов в печени.

Следует отметить, что проблема создания эффективного гепатопротекторного препарата, отвечающего вышеприведенным требованиям, остается до настоящего времени недостаточно разработанной и, в связи с этим, актуальной для решения задач здравоохранения по сохранению полноценного здоровья народонаселения России [1, 2].

Выполненные нами исследования, а также многолетний опыт проведения экспериментальных исследований по изучению микроорганизмов, обладающих пробиотическими свойствами, и практического использования лекарственных средств и препаратов, созданных на их основе, позволили нам полагать с высокой степенью вероятности о наличии возможности разработки нового пробиотического гепатопротекторного средства [2, 3].

**Цель исследования** — выбор микроорганизмов для конструирования комплексного пробиотического препарата с выраженным гепатопротекторным действием.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Работа выполнена в ФГБУН Институте иммунологии и физиологии УрО РАН.

Для решения поставленной задачи необходимо было, в первую очередь, провести исследования по выбору конкретного вида и штамма пробиотического микроорганизма, в экспериментальных исследованиях изучить его биологические свойства и по совокупности полученных результатов принять решение о целесообразности создания на его основе экспериментального образца нового гепатопротекторного средства.

В настоящее время накоплен значительный научный материал, свидетельствующий о том, что наибольшим биологическим потенциалом и набором конкретных позитивных свойств, которые эффективно можно использовать для разработки пробиотических препаратов являются непатогенные спорообразующие микроорганизмы рода *Bacillus* и, в частности, различные штаммы сенной палочки. Установлено, что они характеризуются выраженными антагонистическими свойствами в отношении многих видов условно-патогенных и патогенных микроорганизмов,

способностью оказывать иммуномодулирующее действие (в основном за счет стимулирования различных звеньев клеточного и гуморального иммунитета), а также обладают антитоксическими, антиаллергическими, противорадиационными и другими эффектами [4, 5].

Выбор бактериальных микроорганизмов, перспективных для использования их в качестве основы для создания новых пробиотических препаратов, осуществляли по следующим критериям: результатам всестороннего изучения их родовых и видовых характеристик, а также биологических особенностей выбранных штаммов; отсутствию патогенных свойств, безопасности для человека (в комплексных доклинических исследованиях); степени антагонистической активности в отношении различных видов патогенных и условно-патогенных микроорганизмов; уровню биохимических свойств; отсутствию гемолитической активности, выраженности лечебных и протективных свойств пробиотиков, сконструированных с их использованием [6, 7].

Согласно требованиям, приведенным в Санитарных правилах СП 1.2.731–99, штаммы *Bacillus subtilis* относятся к сапрофитам, то есть микроорганизмам, непатогенным для человека и животных, работа с ними не требует специальных мер биологической защиты.

Определение антагонистической активности проводили в отношении тест-культур, полученных из музея ФГБУ ГИСК им. Л. А. Тарасевича. Для проведения исследований использовали штаммы тест-культур: *Staphylococcus aureus* 209P, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 14990, *Candida albicans* ИМВ 690, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9024, *Salmonella typhimurium* 55, *Escherichia coli* 0157, *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615, *Proteus vulgaris* 177.

Родовую индикацию и видовую идентификацию проводили используя традиционные микробиологические методы исследований, а также идентификационные наборы МИКРО-ЛА-ТЕСТ и книги кодов СМММ-2 и Микроб-Автомат.

Конструирование, приготовление, изучение свойств, условий хранения и создаваемых на их основе экспериментальных образцов пробиотических препаратов осуществляли в соответствии с действующими требованиями и рекомендациями, изложенными в источниках литературы, посвященных вопросам биотехнологии [8, 9].

Отбор проб для бактериологических исследований проводили установленным порядком. Идентификацию выделенных микроорганизмов

осуществляли после получения чистых культур по морфологическим, культуральным, биохимическим и антигенным признакам с использованием идентификационных наборов.

Статистическую обработку осуществляли с помощью пакетов компьютерных программ Microsoft Office Excel 2007 и “Statistica 6.0”. Результаты представлены в виде средней арифметической (M) и средней ошибки среднего арифметического (m). Использовали метод дисперсионного анализа (ANOVA). Оценку нормальности распределения полученных данных проводили по методу Колмогорова-Смирнова. Для оценки достоверности межгрупповых различий использовали непараметрический U-критерий Манна-Уитни и параметрический F-критерий Фишера в зависимости от нормальности распределения данных. Проверку статистических гипотез осуществляли при критическом уровне значимости  $p < 0,05$ . В ряде случаев для сравнения зависимых выборок использовали непараметрический W-критерий Вилкоксона.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

На данном этапе нами были проведены экспериментальные исследования по углубленному изучению биологических свойств вышеперечисленных штаммов с целью обоснования объективных критериев для выбора конкретного штамма, обладающего наиболее приемлемыми свойствами для конструирования на его основе экспериментального образца гепатопротекторного средства.

Одним из важных критериев безопасного применения пробиотических штаммов для создания фармакологических препаратов является отсутствие у них гемолитической активности.

Анализ полученных сравнительных экспериментальных данных свидетельствует о том, что все выбранные для исследований бактериальные штаммы обладают достаточно высоким уровнем специфической антагонистической активности и способны подавлять рост и размножение тест-штаммов различных групп патогенности, **Таблица 1**.

**Таблица 1.** Оценка антагонистической активности спорных культур штаммов *Bacillus subtilis* ( $M \pm m, n=3$ )

| № п/п | Образцы препаратов                      | Зоны угнетения роста тест-культур, мм |   |                              |                                    |                                    |                            |   |
|-------|---|---------------------------------------|---|------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|----------------------------|---|
|       |   | <i>Candida albicans</i> 690           | <i>Staphylococcus epidermidis</i> 14990 | <i>Escherichia coli</i> 0157 | <i>Staphylococcus aureus</i> 209 P | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 9027 | <i>Proteus vulgaris</i> 15 | <i>Streptococcus pyogenes</i> ATCC19615 |
| 1     | 2                                       | 3                                     | 4                                       | 5                            | 6                                  | 7                                  | 8                          | 9                                       |
| 1.    | <i>Bacillus subtilis</i> B-2335         | 23,6±2,0*                             | 24,5±2,3*                               | 26,9±3,1*                    | 20,8±1,8*                          | 22,3±1,9*                          | 14,4±1,1*                  | 21,2±1,9*                               |
| 2.    | <i>Bacillus subtilis</i> B-4759         | 20,2±1,8*                             | 21,6±1,9*                               | 23,2±2,1*                    | 19,8±1,7*                          | 17,1±1,5*                          | 16,6±1,5*                  | 17,9±1,6*                               |
| 3.    | <i>Bacillus subtilis</i> B-2895         | 20,3±1,9*                             | 21,8±1,9*                               | 22,5±2,0*                    | 19,3±1,6*                          | 18,4±1,8*                          | 14,6±1,2*                  | 17,3±1,7*                               |
| 4.    | <i>Bacillus subtilis</i> B-3679         | 24,7±2,8*                             | 20,5±1,8*                               | 23,6±2,2*                    | 24,0±2,6*                          | 17,7±1,6*                          | 12,9±1,1*                  | 21,5±2,0*                               |
| 5.    | <i>Bacillus subtilis</i> B-9906         | 28,1±3,7*                             | 26,0±3,2*                               | более 35                     | 23,3±2,2*                          | 21,6±1,8*                          | 19,4±1,6*                  | 23,1±2,2*                               |
| 6.    | <i>Bacillus subtilis</i> B-9909         | 20,6±2,0*                             | 19,2±1,6*                               | 22,8±2,1*                    | 22,2±2,1*                          | 15,6±1,3*                          | 13,4±1,1*                  | 20,6±1,9*                               |
| 7.    | Контроль (стерильное вазелиновое масло) | 0,0±0,0                               | 0,0±0,0                                 | 0,0±0,0                      | 0,0±0,0                            | 0,0±0,0                            | 0,0±0,0                    | 0,0±0,0                                 |

**Примечание:** \* – достоверные ( $p < 0,05$ ) различия по U-критерию Манна-Уитни по отношению к группе «Контроль (стерильное вазелиновое масло)».

**Таблица 2.** Гемолитическая активность исследуемых штаммов *Bacillus subtilis* ( $M \pm m$ ,  $n=3$ )

| Исследуемая культура            | Срок наблюдения, сут. | Зона гемолиза на питательных средах, мм  |                   |                                |                   |                                |
|---------------------------------|-----------------------|--|-------------------|--------------------------------|-------------------|--------------------------------|
|                                 |                       | Плотная питательная среда Гаузе 2 с добавлением дефибринированной кроличьей крови, % |                   |                                |                   |                                |
|                                 |                       | 10% кровяной агар  | 10% кровяной агар | 20% кровяной агар + 1% глюкоза | 10% кровяной агар | 20% кровяной агар + 1% глюкоза |
| № серии                         |                       | 18   | 19                | 19                             | 20                | 17                             |
| <i>Bacillus subtilis</i> B-2335 | 2                     | 0,0±0,0  | 0,0±0,0           | 0,0±0,0                        | 0,0±0,0           | 0,0±0,0                        |
|                                 | 3                     | 0,0±0,0  | 0,0±0,0           | 0,0±0,0                        | 0,0±0,0           | 0,0±0,0                        |
| <i>Bacillus subtilis</i> B-4759 | 2                     | 1,2±0,1  | 1,4±0,2           | 1,1±0,1                        | 2,3±0,3           | 1,0±0,1                        |
|                                 | 3                     | 1,3±0,1  | 1,0±0,1           | 1,2±0,1                        | 2,0±0,2           | 0,0±0,0                        |
| <i>Bacillus subtilis</i> B-2895 | 2                     | 1,0±0,1  | 1,1±0,1           | 1,0±0,1                        | 3,5±0,8           | 2,3±0,4                        |
|                                 | 3                     | 1,3±0,1  | 1,2±0,1           | 1,1±0,1                        | 5,2±1,4           | 1,2±0,1                        |
| <i>Bacillus subtilis</i> B-3679 | 2                     | 2,8±0,6  | 2,1±0,1           | 0,0±0,0                        | 2,0±0,2           | 2,1±0,2                        |
|                                 | 3                     | 2,3±0,4  | 2,0±0,3           | 0,0±0,0                        | 2,5±0,5           | 2,7±0,5                        |
| <i>Bacillus subtilis</i> B-9906 | 2                     | 0,0±0,0  | 0,0±0,0           | 0,0±0,0                        | 0,0±0,0           | 0,0±0,0                        |
|                                 | 3                     | 0,0±0,0  | 0,0±0,0           | 0,0±0,0                        | 0,0±0,0           | 0,0±0,0                        |
| <i>Bacillus subtilis</i> B-9909 | 2                     | 1,0±0,1  | 0,0±0,0           | 0,0±0,0                        | 0,0±0,0           | 1,1±0,1                        |
|                                 | 3                     | 1,3±0,1  | 0,0±0,0           | 0,0±0,0                        | 0,0±0,0           | 1,2±0,1                        |

**Примечание:** достоверных ( $p < 0,05$ ) различий по U-критерию Манна-Уитни по отношению к соответствующим группам высевных на «плотной питательной среде Гаузе 2 с добавлением дефибринированной кроличьей крови» не установлено.

В наших исследованиях (Таблица 2), установлено полное отсутствие гемолитических свойств у штаммов *Bacillus subtilis* B-2335, *Bacillus subtilis* B-9906, незначительный уровень гемолитической активности обнаружен у штаммов *Bacillus subtilis* B-4759, *Bacillus subtilis* B-9909, *Bacillus subtilis* B-3679 и *Bacillus subtilis* B-2895.

### ОБСУЖДЕНИЕ

Отмечено, что наибольшая антагонистическая активность определяется у штаммов *Bacillus subtilis* B-4759, *Bacillus subtilis* B-9906, *Bacillus subtilis* B-9909, в тоже время размеры зоны подавления у штамма *Bacillus subtilis* B-9906 были практически во всех случаях выше, чем у других сравниваемых штаммов. Таким образом, оценка биохимической активности изучаемых штаммов, показала, что протеолитические и амилолитические ферменты при глубинном способе культивирования в наибольших концентрациях синтезируются в жидких питательных средах такими штаммами, как *Bacillus subtilis* B-9906, *Bacillus subtilis* B-4759, *Bacillus subtilis* B-2335.

Причем штаммы *Bacillus subtilis* B-9906, *Bacillus subtilis* B-4759 обладали способностью продуцировать указанные ферменты не только сравнительно в более высоких концентрациях, но и на более ранние сроки культивирования.

### ВЫВОДЫ

1. Наибольшую антагонистическую активность в отношении патогенных и условно-патогенных микроорганизмов проявили пробиотические штаммы *Bacillus subtilis* B-2335, B-4759, B-9906.

2. Установлено, что штаммы *Bacillus subtilis* B-9906, *Bacillus subtilis* B-4759 обладали способностью продуцировать протеолитические и амилолитические ферменты не только сравнительно в более высоких концентрациях, но и на более ранние сроки культивирования;

3. Установлено полное отсутствие гемолитических свойств у штаммов *Bacillus subtilis* B-2335, *Bacillus subtilis* B-9906;

4. Наиболее перспективными штаммами для конструирования комбинированного биогепа-

топротектора являются три штамма: *Bacillus subtilis* B-2335, B-4759, B-9906.

Работа выполнена по теме из Плана НИР ИИФ УрО РАН, № гос. регистрации АААА-А18-118020690020-1.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. *Забокрицкий Н. А.* Экспериментальная оценка коррекции гуморального иммунитета гепатопротекторным препаратом гепатобиол у лабораторных животных с острым токсическим гепатитом. Российский иммунологический журнал, 2017, 11, 2(20), 123–126. [*Zabokritskiy N. A.* Experimental estimation of correction of humoral immunity hepatoprotective drug hepatobiol in laboratory animals C acute toxic hepatitis, 2017, 11, 2(20), 123–126].
2. *Забокрицкий Н. А.* Разработка экспериментального образца нового гепатопротектора. Российский иммунологический журнал, 2018, 3, 12(21), 301–305. [*Zabokritskiy N. A.* Development of experimental sample of a new hepatoprotector, 2018, 3, 12(21), 301–305].
3. *Забокрицкий Н. А.* Оценка иммунотропного действия пробиотика бацилакт в составе трансдермальных терапевтических систем. Российский иммунологический журнал, 2017, 11, 2(20), 126–129. [*Zabokritskiy N. A.* Preclinical evaluation of immunotropic action of probiotics bacilack transdermal therapeutic system, 2017, 11, 2(20), 126–129].
4. *Holzapfel W. H., Schillinger U.* Introduction to pre- and probiotics. Food Research International 35, 2002, 109–116.
5. *Kailasapathy K. A., Chin J.* Survival and therapeutic potential of probiotic organisms with reference to *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* spp. Immunol. Cell. Biol., 2000, 78, 80–88.
6. *Lee Y. K., Salminen S.* Handbook of Probiotics and Prebiotics. John Wiley and Sons, Ltd., 2009, 132–144.
7. *Russel J., Cohn R.* Probiotics. U.K., Edinburgh: LEN-NEX Corp. 2012, 5–58.
8. *Забокрицкий Н. А.* Обоснование направлений в разработке и экспериментальном изучении новых фармакологических препаратов на основе пробиотиков и их биологически активных продуктов: автореф. дис. ... д-ра. мед. наук., 2014. 3–16. [*Zabokritskiy N. A.* Study areas in the development and experimental study of new pharmacological products based on probiotics and their bioactive products: abstract of dis. ... dr. med. sciences, 2014. 3–16].
9. *Лабинская А. С.* Микробиология с техникой микробиологических исследований. Бином, М., 2012. 72–124. [*Labinskaya A. S.* Microbiology with technique of microbiological studies.: Binom, Moscow, 2012. 72–124].

## IMMUNOBIOLOGICAL ASPECTS OF THE APPLICATION OF THE NEW METABIOTICS

© 2019 N. A. Zabokritskiy

E-mail: pharmusma@rambler.ru

Institute of Immunology and Physiology UrB RAS, Ekaterinburg, Russia

Received: 23.05.2019. Accepted: 28.06.2019

The paper presents the results of preclinical studies on the choice of microorganisms for the design of a complex probiotic drug with a pronounced hepatoprotective effect. It has been experimentally established that probiotic strains *Bacillus subtilis* B-2335, B-4759, B-9906 showed the greatest antagonistic activity against pathogenic and opportunistic microorganisms. Experimental data have been obtained that strains *Bacillus subtilis* B-9906, *Bacillus subtilis* B-4759 had the ability to produce proteolytic and amylolytic enzymes not only relatively in higher concentrations, but also for earlier periods of cultivation;. It was found that the most promising strains for the design of a combined biohepatoprotector are three strains: *Bacillus subtilis* B-2335, B-4759, B-9906.

*Key words:* probiotic, *Bacillus subtilis* strains, design

### Author:

**Zabokritskiy N. A.**, MD, PhD, assistant professor of the laboratory of immunophysiology and immunopharmacology of the Institute of Immunology and Physiology of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Yekaterinburg, Russia.

Yekaterinburg, Institute of immunology and physiology, Ural branch of the Russian Academy of Sciences. Phone: +73433740070,

E-mail: pharmusma@rambler.ru