

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ОБОСНОВАНИЕ ВОЗМОЖНОСТИ СОЗДАНИЯ НОВОГО МЕТАБОЛИЧЕСКОГО ПРЕПАРАТА

© 2018 г. Н. А. Забокрицкий, П. А. Сарапульцев

ФГБНУ Институт иммунологии и физиологии Уральского отделения  
Российской академии наук Екатеринбург, Россия

Поступила: 12.05.2018. Принята: 18.06.2018

В работе приведены результаты исследования, посвященные изучению возможности создания нового метаболического препарата (с использованием биологически активных веществ пробиотического штамма *Bacillus subtilis B-3679*) для применения в качестве профилактического и лечебного средства при воспалительных заболеваниях тканей и органов ротовой полости. Ранее метаболиты споровых пробиотических микроорганизмов практически не использовались для конструирования медицинских фармакологических препаратов.

**Ключевые слова:** пробиотические микроорганизмы, метабитик, экспериментальное обоснование

DOI: 10.31857/S102872210002398-2

Адрес: 620049, Екатеринбург, ФГБНУ Институт иммунологии и физиологии УрО РАН, Забокрицкий Николай Александрович. Тел.: +79221101114, 8(343)374 00 70.

E-mail: pharmusma@rambler.ru

### Авторы:

**Забокрицкий Н. А.**, д.м.н., доцент, старший научный сотрудник лаборатории иммунофизиологии и иммунофармакологии, ФГБНУ Институт иммунологии и физиологии УрО РАН, Екатеринбург, Россия;

**Сарапульцев П. А.**, д.м.н., профессор, главный научный сотрудник лаборатории иммунопатофизиологии, ФГБНУ Институт иммунологии и физиологии УрО РАН, Екатеринбург, Россия.

### ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время в Российской Федерации наблюдаются существенные изменения в окружающей среде обитания. Нарастают неблагоприятные факторы (как экологические, так и социальные), ухудшаются условия жизни отдельных групп населения (особенно в регионах и сельской местности), качество атмосферного воздуха, продуктов питания, питьевой воды. Обеспеченность и доступность современными эффективными и безопасными лекарственными средствами достигли такого уровня, что это стало серьезно влиять на состояние здоровья населения страны, уровень заболеваемости и эпидемическую ситуацию по ряду инфекций [1, 2].

Поданным различных источников существенно увеличилась не только общая инфекционная

заболеваемость, но и количество инфекций, отличающихся вялотекущим, рецидивирующим и хроническим течением. Возросло и число инфекционных поражений, вызываемых условно-патогенными возбудителями [3].

Значительное внимание уделяется изучению различных видов таких микроорганизмов, их этиологической и патогенетической роли в возникновении тех или иных патологических состояний [2, 3].

Данные о заболеваемости людей пародонтизом и пародонтозом (более чем 95 и 80% взрослого населения соответственно) хорошо известны. В настоящее время можно сказать, что это два наиболее распространенных в мире заболевания. Лечение их, как правило, комплексное, достаточно сложное, длительное и в целом дорогостоящее. Предлагаемые лекарственные и профилактические средства недостаточно эффективны [3].

Исходя из этого, целью нашего исследования явилось изучение возможности создания нового метаболического препарата (с использованием биологически активных веществ пробиотического штамма *Bacillus subtilis B-3679*) для применения в качестве профилактического и лечебного средства при воспалительных заболеваниях тканей и органов ротовой полости. Ранее метаболиты споровых пробиотических

микроорганизмов практически не использовались для конструирования медицинских фармакологических препаратов.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Работа выполнена в ФГБУН Институте иммунологии и физиологии УрО РАН.

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 [3, 4].

Использовали бактериальные споровые культуры пробиотического штамма *Bacillus subtilis* В-3679. Данный штамм депонирован и находится на постоянном хранении во Всероссийской Коллекции Промышленных Микроорганизмов (ФГУП ГосНИИГенетика).

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 [4, 5].

В состав экспериментального образца препарата дентозар были включены метаболиты

пробиотических бактериальных клеток *Bacillus subtilis* ВКПМ В-3679, прополис, никотиновая кислота, кальция пантотенат, пиридоксин, ментол, эфирные масла мяты перечной, шалфей, лаванды, а также глицерин.

Комплекс биологически активных веществ получали в лабораторных условиях по имеющимся в настоящее время в научной литературе рекомендациям [3, 4, 6, 7].

Метаболиты выделяли из КЖ, находящихся в конце экспоненциальной фазы роста бактериальных клеток *Bacillus subtilis* штаммов В-3679 при их глубинном культивировании.

Качественное и количественное содержание метаболитов определяли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. Разделение проводили при комнатной температуре с использованием колонки Supelcosil™ LC-18 (250 x 4,6 мм, размер частиц  $\frac{3}{4}$  5 мкм).

Химический состав выделяемых БАВ в среднем характеризовался следующими показателями: белково-полисахаридный комплекс – 250–300 мг.г<sup>-1</sup>; (общее количество белка) свободные аминокислоты – 120–140 мг.г<sup>-1</sup>; гексозамин – 40–50 мг.г<sup>-1</sup>; пуриновые и пиримидиновые основания: аденин – 16–17 мг.г<sup>-1</sup>, гуанин – 2–3 мг.г<sup>-1</sup>, цитозин – 2–4 мг.г<sup>-1</sup>, тиамин – 3–5 мг.г<sup>-1</sup>, урацил – 12–14 мг.г<sup>-1</sup>; водорастворимые витамины: пиридоксин (В6) – 1,5 мкг.г<sup>-1</sup>, рибофлавин (В2) – 1,7 мкг.г<sup>-1</sup>; ферментативный комплекс: активность протеолитических ферментов – 900–950 ед.г<sup>-1</sup>, активность амилолитических ферментов – 1000–1100 ед.г<sup>-1</sup>; антибиотики и антибиотикоподобные соединения – 0,1–0,5%; другие соединения – менее 5%.

Незначительные колебания химического состава зависели в основном от условий культивирования (качества питательных сред) и технологических особенностей выделения БАВ [8].

Моделирование экспериментальной генерализованной сальмонеллезной инфекции проводили методом заражения лабораторных животных бактериальной культурой *Salmonella typhimurium*, для чего белым мышам однократно внутривенно вводили ее суточную взвесь в дозе, соответствующей величине одной LD<sub>50</sub>. Значение величины LD<sub>50</sub>, полученное в предварительных экспериментах, составляло 2,8x10<sup>6</sup> микробных клеток.

Для оценки активности клеточных факторов неспецифического иммунитета у экспериментальных животных получали клетки перитонеального экссудата. Метаболическую активность

фагоцитов определяли в НСТ-тесте. Исследование фагоцитарной активности нейтрофилов и моноцитов периферической крови, перитонеальных макрофагов осуществляли путем спектрофотометрии клеточной суспензии (КМС) с добавлением соответствующих красителей. Определение количества Т- и В-лимфоцитов периферической крови проводили в реакции розеткообразования с отмытыми эритроцитами барана.

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 статистиче-

ских гипотез осуществляли при критическом уровне значимости  $p < 0,05$ . В ряде случаев для сравнения зависимых выборок использовали непараметрический W-критерий Вилкоксона.

### РЕЗУЛЬТАТЫ

Поскольку ранее по данным как зарубежной, так и отечественной научной литературы, не были известны случаи использования биологически активных веществ, получаемых из споровых пробиотических микроорганизмов, для конструирования медицинских фармакологических препаратов, определенный интерес представляло изучение конкретных механизмов действия БАВ, в частности: наличие антагонистических свойств в отношении различных условно-патогенных (патогенных) микроорганизмов, их влияние на некоторые биохимические и иммунологические показатели организма экспериментальных животных [3, 7, 8].

Сравнительные исследования были проведены с использованием споровой культуры и БАВ исходного штамма *Bacillus subtilis* ВКПМ В-3679,

**Таблица 1.** Влияние опытных препаратов на рост бактериальных тест-культур ( $M \pm m$ ,  $n=3$ )

№ 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	Споровая культура штамма ВКПМ В3679	24,4±2,8*	20,6±1,4	23,7±2,2*	24,8±2,1	17,2±1,1	12,3±1,1	21,9±1,4
2	Комплекс БАВ <sup>1</sup> штамма ВКПМ В3679 (общее количество препарата в лунке): 1 мг; 5 мг; 10 мг; 25 мг; 50 мг;	5,2±1,4* 9,1±1,6* 12,7±1,8* 26,2±1,9 28,6±2,1	4,5±1,3* 10,2±2,4* 13,1±2,0* 25,3±2,6* 30,3±1,9*	6,2±1,1* 8,6±2,3* 10,9±1,7* 24,0±1,8* 24,4±3,1*	5,4±1,8* 8,2±1,6* 12,7±1,2* 26,8±3,2 28,4±3,3	4,3±1,1* 7,2±2,3* 10,0±2,1* 18,4±1,5 20,9±3,4*	3,8±1,2* 6,3±2,0* 10,6±2,4* 13,3±2,5 15,8±3,0	4,6±1,1* 9,2±1,3* 11,9±2,7* 18,4±3,2 19,2±2,6
3	МИБП «Биоспорин»	29,0±2,9	19,2±1,0	32,5±2,8	26,3±2,3	15,6±1,2	14,6±1,3	19,2±1,5
4	Контроль (стерильное вазелиновое масло)	0	0	0	0	0	0	0

Примечание: — 1) 1 — Указаны весовые количества сублимационно высушенного комплекса метаболитов *Bacillus subtilis*.  
2) \* — достоверные ( $p < 0,05$ ) различия по U-критерию Манна-Уитни в группах «Споровая культура штамма ВКПМ В3679» и «Комплекс БАВ<sup>1</sup> штамма ВКПМ В3679» по отношению к группе «МИБП «Биоспорин»».

а также коммерческого медицинского иммуно-биологического препарата “Биоспорин”.

Представлены данные по влиянию изучаемых БАВ на рост и размножение бактериальных тест-культур (таб. 1).

В дополнение приводим также данные о степени патогенности используемых тест-культур (таб. 2).

**Таблица 2.** Степень патогенности используемых тест-культур

№, п/п	Тест-культуры	Группа патогенности
1	<i>Candida albicans</i> 690	IV
2	<i>Staphylococcus epidermidis</i> 14990	IV
3	<i>Escherichia coli</i> 0157	IV
4	<i>Staphylococcus aureus</i> 209 P	IV
5	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 9027	IV
6	<i>Proteus vulgaris</i> 15	IV
7	<i>Streptococcus pyogenes</i> ATCC19615	IV

В дальнейшем существенный интерес представляло экспериментальное изучение специфической эффективности комплекса БАВ, являющегося основой для производства зубного эликсира дентозар, не только *in vitro*, но и *in vivo*.

У зараженных белых мышей развивался генерализованный инфекционный процесс, что приводило к летальному исходу более 60% нелеченных животных. Гибель животных регистрировалась на 6–7 сутки после заражения. Микробиологические исследования подтверждали поставленный диагноз. Количество вы-

севаемых из органов инфицированных животных клеток *Salmonella typhimurium* в среднем достигало: в крови  $1,5 \cdot 10^2 \pm 0,15 \cdot 10^2$  кл.мл<sup>-1</sup>, в печени  $2,6 \cdot 10^4 \pm 0,12 \cdot 10^4$  кл.г<sup>-1</sup>, в селезенке  $2,19 \cdot 10^4 \pm 0,15 \cdot 10^4$  кл.г<sup>-1</sup>.

Представлены результаты экспериментальных исследований по изучению состава крови и некоторых показателей неспецифического иммунитета у белых мышей при экспериментальном сальмонеллезе и эффективности применения для их лечения биологически активных веществ (таб. 3, 4), которые свидетельствуют о том, что у лабораторных животных с подтвержденным диагнозом генерализованной сальмонеллезной инфекции при назначении им для лечения комплекса БАВ наблюдается определенные изменения лейкоцитарной формулы. Так общая концентрация лейкоцитов, а также лимфоцитов, незрелых и зрелых нейтрофилов и моноцитов были существенно ниже, чем аналогичные показатели у больных животных. Обращает на себя внимание сравнительно высокий уровень эозинофилов у белых мышей, леченных биоспорином. В целом можно говорить о тенденции к нормализации лейкоцитарной формулы под влиянием БАВ, а также биоспорина.

Что касается изученных неспецифических факторов иммунитета, то следует отметить, что под влиянием БАВ происходит увеличение комплементарной активности, уровня лизоцима, концентрации циркулирующих иммунных комплексов, а также общей бактерицидной активности сыворотки крови. Данные изменения свидетельствуют об определенной неспецифической стимуляции данных факторов комплексом БАВ.

**Таблица 3.** Основные характеристики показателей крови ( $M \pm m$ , n=8)

Группа экспериментальных животных	Концентрация лейкоцитов, $10^6$ кл·см <sup>-3</sup>	Лейкоцитарная формула крови				
		Лимфоциты, %	Незрелые нейтрофилы, %	Зрелые нейтрофилы, %	Моноциты, %	Эозинофилы, %
Леченные БАВ	$3,6 \pm 0,4^*$	$59,0 \pm 2,3^*$	$2,0 \pm 0,3^*$	$22,1 \pm 0,4$	$3,8 \pm 0,3^*$	$0,3 \pm 0,1^*$
Леченные биоспорином	$2,9 \pm 0,3^*$	$63,4 \pm 1,2^*$	$2,5 \pm 0,4^*$	$24,4 \pm 0,7$	$3,8 \pm 0,2^*$	$2,2 \pm 0,1^*$
Контроль (нелеченные, с экспериментальным сальмонеллезом)	$5,0 \pm 0,6$	$75,5 \pm 3,0$	$1,5 \pm 0,2$	$24,0 \pm 0,3$	$5,5 \pm 0,2$	$0,8 \pm 0,1$
Контроль (интактные животные)	$2,7 \pm 0,2$	$81,1 \pm 2,3$	$2,9 \pm 0,1$	$15,3 \pm 0,3$	$2,6 \pm 0,3$	$0,3 \pm 0,1$

*Примечание:* — оценку различий средних значений определяли методом дисперсионного анализа (ANOVA). \* — достоверные ( $p < 0,05$ ) различия по F-критерию Фишера по сравнению с группой «Контроль (нелеченные, с экспериментальным сальмонеллезом)».

**Таблица 4.** Некоторые показатели неспецифического иммунитета ( $M \pm m$ ,  $n=8$ )

Группа экспериментальных животных	Оцениваемые показатели на 5 сутки наблюдения				
	Комплиментарная активность, $CH_{50}$	Уровень лизоцима, ед. оптической плотности	ОБАСК, относительных единиц	ФИ, %	Концентрация ЦИК, ед. оптической плотности
Леченные БАВ	28,5±1,9*	0,61±0,01*	13,9±0,3*	46,1±0,1	0,128±0,015*
Леченные биоспорином	26,4±2,3*	0,58±0,02	13,6±0,3*	43,0±0,2	0,121±0,001*
Контроль (нелеченные, с экспериментальным сальмонеллезом)	20,2±2,0	0,55±0,06	15,2±0,4	34,2±0,3	0,031±0,002
Контроль (интактные животные)	26,7±0,7	0,49±0,01	3,2±0,1	34,1±0,1	0,012±0,001

Примечание: – оценку различий средних значений определяли методом дисперсионного анализа (ANOVA). \* – достоверные ( $p < 0,05$ ) различия по F-критерию Фишера по сравнению с группой «Контроль (нелеченные, с экспериментальным сальмонеллезом)».

### ОБСУЖДЕНИЕ

Экспериментально установлено, что комплекс БАВ обладает достаточно высокой антагонистической активностью в отношении изученных 7 штаммов микроорганизмов, относящихся к II – IV группам патогенности. Степень подавления роста была сравнима с аналогичным показателем как для исходной споровой культуры штамма В3679, так и спорового пробиотического медицинского иммунобиологического препарата «Биоспорин».

Укажем также, что повышение концентрации, используемых в опытах БАВ, с 25 до 50 мг было максимальным и уже существенно не влияло на увеличение зон угнетения. Данный факт свидетельствует о том, что и величина однократной дозы фармакологического средства, созданного на основе комплекса БАВ, должна также находиться в данных пределах.

Существенным является установленный в последующих наших опытах тот факт, что выживаемость подопытных животных, леченных БАВ, составляла 100%, а леченных биоспорином – 85%. В ходе исследований на различные сроки у экспериментальных животных наблюдали также полную (для БАВ) или частичную (для биоспорина) элиминацию клеток *Salmonella typhimurium*.

На основании проведенного исследования можно сделать следующие **выводы**:

Биологически активные вещества, являющиеся основой для приготовления эликсира дентозар, обладают не только выраженными

антагонистическими свойствами в отношении различных условно-патогенных (патогенных) бактерий, но и определенной терапевтической эффективностью, о чем свидетельствуют результаты по излечиваемости инфицированных *Salmonella typhimurium* белых мышей.

Работа выполнена в рамках госзадания ФГБУН ИИФ УрО РАН (Регистрационный номер НИОКТР № 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.* Оценка иммуностропного 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].
3. *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].

4. 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.*]
5. Holzapfel W. H., Schillinger U. Introduction to pre- and probiotics. *Food Research International* 35, 2002, 109–116.
6. 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.
7. Lee Y. K., Salminen S. *Handbook of Probiotics and Prebiotics*. John Wiley and Sons, Ltd., 2009, 132–144.
8. Russel J., Cohn R., Probiotics. U.K., Edinburgh: LEN-NEX Corp. 2012, 5–58.

## EXPERIMENTAL JUSTIFICATION OF THE POSSIBILITY OF CREATING THE NEW METABOLIC DRUG

© 2018 N. A. Zabokritskiy, P. A. Sarapultsev

*Federal State Budgetary Scientific Institution Research Institute of Immunology and Physiology  
of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Ekaterinburg, Russia*

**Received:** 12.05.2018. **Accepted:** 18.06.2018

This scientific work is devoted to the study of the possibility of creating a new metabolic drug (using biologically active substances of the probiotic strain *Bacillus subtilis B-3679*) for use as a preventive and therapeutic agent for inflammatory diseases of tissues and organs of the oral cavity. Previously, the metabolites of spore probiotic microorganisms were practically not used for the design of medical pharmacological preparations.

*Key words:* probiotic microorganisms, metabiotic, experimental study

### Authors:

**Zabokritskiy N. A.**, ✉ MD, PhD, assistant professor, Senior Researcher, Laboratory of immunophysiology and immunopharmacology, Research Institute of Immunology and Physiology of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Ekaterinburg, Russia; 620049, Ekaterinburg, Research Institute of Immunology and Physiology of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences. Phone: +79221101114, 8(343)374 00 70. **E-mail:** pharmusma@rambler.ru;

**Sarapultsev P. A.**, MD, PhD, Professor, chief researcher of the laboratory of immunopathophysiology, Research Institute of Immunology and Physiology of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Ekaterinburg, Russia.