

РАЗРАБОТКА ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ОБРАЗЦА НОВОГО ГЕПАТОПРОТЕКТОРА

© 2018 г. Н. А. Забокрицкий

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

Поступила: 13.05.2018. Принята: 23.06.2018

Настоящие исследования посвящены конструированию комбинированного гепатопротектора с использованием культуры штамма *Bacillus subtilis B-9906* и выделенного из этого же штамма метаболического комплекса. Выполненная в дальнейшем серия экспериментов с использованием эксплантированных крысиных гепатоцитов при моделировании токсического поражения четыреххлористым углеродом в прямых опытах продемонстрировала наличие гепатопротекторного действия непосредственно у метаболического комплекса. Повышение пролиферативной активности культуры клеток гепатоцитов наблюдали уже через 48 часов, полностью культура восстанавливалась через 96 часов.

Ключевые слова: пробиотические микроорганизмы, биологически активные вещества, метаболиты, конструирование, гепатопротекторное действие

DOI: 10.31857/S102872210002399-3

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

Автор:

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

ВВЕДЕНИЕ

Несмотря на достигнутые успехи современной фармакологии и практической медицины в лечении патологий гепатобилиарной системы, далеко не всегда можно непосредственно воздействовать на конкретные факторы, вызывающие подобные состояния. Чаще всего клиницисты сталкиваются с ситуациями, когда для уменьшения активности патологических процессов приходится назначать препараты, как правило, влияющие на патогенетические механизмы, лежащие в основе различных поражений печени [1].

Кроме того, в настоящее время увеличивается количество больных вирусными гепатитами, а также гепатитами токсической, алкогольной и лекарственной этиологий. Они являются этиологической причиной более 50% случаев цир-

розов печени. Ежегодно в мире регистрируется более 500 млн. заболевших вирусными гепатитами. В РФ количество больных с циррозом возрастает на 200 тыс. чел. в год. Ежегодное увеличение числа больных гепатобилиарными заболеваниями весьма значительное и составляет от 15 до 30% населения [2].

Приведенные факты, с учетом потенциальной опасности постоянного их нарастания, охвата все большего количества, в первую очередь, трудоспособного населения РФ, можно без преувеличения отнести не только к широко распространенным, но и к социально-значимым заболеваниям со всеми вытекающими отсюда последствиями [2, 3].

В этой связи целесообразным представлялось использование для лечения различных заболеваний пробиотических препаратов, которые в настоящее время считаются наиболее адекватными и эффективными профилактическими и лекарственными средствами [4, 5, 6].

Исходя из этого, целью нашего исследования явилось создание жидкой лекарственной формы экспериментального образца комбинированного (на основе живых пробиотических бактерий и метаболитов) гепатопротекторного средства для перорального применения.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Работа выполнена в ФГБУН Институте иммунологии и физиологии УрО РАН и в ООО “Гепатобиотехфарм”.

Культивирование бактериальных клеток *Bacillus subtilis*, штамм В-9906 проводили в жидкой питательной среде на термостатированной установке выращивания микроорганизмов УВМТ-12-250 при 37 °С в течение 30 ч. Посевной материал готовили в концентрации не менее $1 \cdot 10^6$ КОЕ·см⁻³. В колбы вносили питательную среду, после чего добавляли посевной материал.

Состав питательной среды: панкреатический гидролизат соевой муки (общий азот — 120–140 мг/%; аминный азот — 20 мг/%); MgSO₄ — 0,1 г·дм⁻³; NaCl — 1,0 г·дм⁻³; CaCl₂ — 7,5 мг/%; FeSO₄ — 0,001 г·дм⁻³; глюкоза — 20,0 г·дм⁻³; дистиллированная вода — до 1,0 дм³. По окончании цикла культивирования содержимое колб сливали в одну емкость, определяли концентрацию КОЕ в 1,0 см³ культуральной жидкости и помещали ее в холодильник на 24 ч (4±2)°С.

Выращивание пробиотических клеток *Bacillus subtilis* штамма В-9906 в объемах, необходимых для получения комплекса метаболитов, производили глубинным способом с использованием ферментера (БИОР-0,1). Для культивирования использовали среду на основе соляно-кислотного гидролизата казеина или панкреатического гидролизата соевой муки с добавлением солей кальция хлорида, сульфатов магния и марганца, хлорида натрия и сульфата железа. Глюкозу и раствор кальция хлорида вносили непосредственно при посеве с соблюдением асептических условий. Выращивание проводили при температуре (36±1)°С. Контроль за развитием культуры клеток осуществляли визуально, путем микроскопии мазков, окрашенных по Цилю-Нильсену. Через 36±4 часов культивирования, что соответствовало окончанию стационарной фазы роста, процесс биосинтеза прекращали, культуральную жидкость охлаждали до температуры (12±3)°С.

Получение комплекса биологически активных веществ (метаболитов), продуцируемых клетками *Bacillus subtilis* штамм В-9906, осуществляли по рекомендуемым методикам [2, 7].

Для обоснования оптимальной концентрации бактериальных клеток штамма в составе разрабатываемого препарата была изучена с использованием метода отсроченного антагонизма (перпендикулярных штрихов) их антагонистическая активность при различных концентрациях в от-

ношении различных видов условно-патогенных микроорганизмов

Экспериментальный образец препарата гепатобиол представлял собой суспензию беловато-серого цвета с запахом и вкусом зеленого яблока со значением рН 7,0–7,54; состав которой соответствовал следующим показателям, масс. %: бактериальные клетки *Bacillus subtilis* штамма В-9906 в количестве — $(1–3) \cdot 10^9$ КОЕ·см⁻³ — 3 ÷ 5; метаболиты бактериальных клеток *Bacillus subtilis* В-9906 — 3 ÷ 5; глицерин — 10 ÷ 15; ароматизатор — 0,05 ÷ 1,0; дистиллированная вода — остальное.

Статистическую обработку осуществляли с помощью пакетов компьютерных программ Microsoft Office Excel 2007 и “Statistica 6.0”. Результаты представлены в виде средней арифметической (М) 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

Изменение концентрации клеток от 1,0 до 10,0 млрд. КОЕ существенного влияния на антагонистическую активность не оказывает. Наиболее высокая антагонистическая активность испытуемой споровой суспензии была определена в отношении микробных культур *S. aureus*, *S. epidermidis* и *Sal. typhimurium*, и менее выраженная — в отношении *C. albicans*, *Ps. aeruginosa* и *E. coli*. (таб. 1).

Значительный интерес представляло изучение протекторного действия биологически активных веществ (метаболитов) непосредственно в прямых опытах с использованием культур гепатоцитов, для получения которых использовали беспородных белых крыс.

Учитывая тот факт, что в заданных условиях опыта методически невозможно было использовать споровые клетки выбранного штамма, а также то, что свои специфические биологические свойства пробиотические микроорганизмы оказывают путем продуцирования и выделения

Таблица 1. Антагонистическая активность суспензии спор *B. subtilis B-9906* ($M \pm m$, $n=3$)

Исследуемый компонент	Концентрация клеток, 10^9 КОЕ $см^{-3}$	Тест-культуры, зоны подавления их роста, мм					
		<i>Staphylococcus aureus 209P</i>	<i>Staphylococcus epidermidis ATCC 14990</i>	<i>Candida albicans ИМВ 690</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa ATCC 9024</i>	<i>Salmonella typhimurium 55</i>	<i>Escherichia coli 0157</i>
Суспензия спор бацилл <i>B. subtilis B-9906</i>	1	23,5±2,6*	24,8±1,7*	14,6±1,2*	11,9±1,8*	16,2±1,0*	11,3±1,1*
	2	23,3±2,6*	22,4±1,3*	15,3±1,4*	12,2±1,5*	17,3±1,3*	12,9±1,6*
	3	23,8±2,6*	22,9±1,8*	16,0±1,3*	13,0±2,2*	18,2±1,8*	13,7±2,3*
	5	23,9±2,0*	23,4±1,9*	16,1±2,3*	13,5±2,0*	18,9±1,7*	14,6±1,8*
	10	24,4±3,3*	24,1±1,2*	17,2±2,9*	15,6±2,4*	19,9±2,6*	15,8±2,0*
Контроль (стерильное вазелиновое масло)	-	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00

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

Таблица 2. Влияние различных концентраций БАВ на пролиферативную активность культуры гепатоцитов через 24 ч ($M \pm m$, $n=3$)

№ проб	Доза БАВ, мг.мл ⁻¹	Количество клеток, ед ($\times 10^4$)				Средняя концентрация клеток	Средний коэффициент прикрепления клеток*
		1 флакон	2 флакон	3 флакон			
I	25	27,0±3,5*	32,0±1,8*	27,0±5,3*	28,6±2,9*	0,52	
II	10	36,0±2,4*	38,3±5,3*	33,0±2,4*	35,7±3,1*	0,65	
III	5	34,8±3,5*	37,0±4,0*	38,0±2,4*	36,6±1,9*	0,67	
IV	3	53,0±1,2	49,2±2,4	56,0±1,2	53,0±5,9	0,95	
V	Контроль	55,5±2,3	54,0±1,8	54,5±4,5	54,6±0,9	1,00	

Примечание: 1) Здесь и далее метаболиты в указанных выше количествах добавляли в ростовую среду непосредственно при посеве, а в последующем через 24, 72 и 96 часов; 2) Коэффициент прикрепления – отношение количества клеток в культуре через 24 ч к исходной концентрации клеток; 3) Коэффициент пролиферации – отношение количества клеток через 72 и 96 ч к начальной концентрации клеток; 4) Коэффициент предельной плотности популяции – отношение количества клеток в 1,0 мл пробы через 96 ч после начала опыта к исходному количеству клеток; 5) * – достоверные ($p < 0,05$) различия по U-критерию Манна-Уитни по отношению к контролю.

в окружающую среду комплекса биологически активных веществ и последующего их воздействия на клетки, органы и ткани макроорганизма, считали возможным и целесообразным использовать для решения данной задачи не споровую суспензию, а только комплекс метаболитов.

Комплекс метаболитов (биологически активных веществ из штамма *Bacillus subtilis B-9906*) был получен аналогичным способом, который ранее использовали для получения БАВ из штамма *Bacillus subtilis B-3697*. Значительных различий в их химическом составе нами установлено не было.

В данной серии экспериментов необходимо было решить следующие задачи:

- определить минимальную концентрацию БАВ, которая будет стимулировать пролиферативную активность культуры гепатоцитов;

- определить минимальную токсическую дозу четыреххлористого углерода для культуры гепатоцитов;

- оценить гепатопротекторное действие биологически активных веществ в отношении культуры гепатоцитов белых крыс в условиях моделирования четыреххлористым углеродом цитотоксического действия (таб. 2).

Результаты исследования влияния различных концентраций БАВ штамма *B. subtilis B-9906* по отношению к клеткам гепатоцитов через 72 и 96 ч наблюдения (таб. 3, 4).

Таблица 3. Влияние различных концентраций БАВ на пролиферативную активность культуры гепатоцитов через 72 ч ($M \pm m$, $n=3$)

№№ проб	Доза БАВ, мг.мл ⁻¹	Количество клеток, ед.($\times 10^4$)				Коэффициент пролиферации клеток
		1 флакон	2 флакон	3 флакон	Средняя концентрация клеток	
I	25	20,6 \pm 3,5*	17,3 \pm 1,2*	24,3 \pm 1,8*	20,7 \pm 4,1*	0,49
II	10	33,5 \pm 4,1*	42,6 \pm 2,4*	32,6 \pm 2,4*	36,2 \pm 5,9*	0,69
III	5	54,5 \pm 0,6*	50,5 \pm 2,9*	44,5 \pm 2,9*	49,8 \pm 5,9*	0,93
IV	3	83,3 \pm 3,5*	88,7 \pm 4,1	85,4 \pm 4,7	85,8 \pm 3,7	1,07
V	Контроль	74,3 \pm 2,4	84,6 \pm 4,7	80,3 \pm 4,1	79,7 \pm 6,0	1,00

Примечание: –* – достоверные ($p < 0,05$) различия по U-критерию Манна-Уитни по отношению к контролю.

Таблица 4. Влияние различных концентраций БАВ на пролиферативную активность культуры гепатоцитов через 96 ч ($M \pm m$, $n=3$)

№№ проб	Доза БАВ, мг.мл ⁻¹	Количество клеток, ед.($\times 10^4$)				Коэффициент пролиферации
		1 флакон	2 флакон	3 флакон	Средняя концентрация клеток	
I	25	19,3 \pm 3,9*	14,8 \pm 1,9*	8,5 \pm 0,5*	14,2 \pm 6,3*	0,05
II	10	126,0 \pm 6,4*	111,0 \pm 3,43*	111,7 \pm 2,4*	116,2 \pm 8,8*	0,44
III	5	257,7 \pm 4,1	271,0 \pm 5,1	261,3 \pm 3,6	263,1 \pm 8,26	0,99
IV	3	294,0 \pm 4,6*	301,3 \pm 4,9*	303,2 \pm 5,0*	299,5 \pm 4,8*	1,14
V	Контроль	258,0 \pm 4,7	265,6 \pm 5,3	267,3 \pm 3,54	263,6 \pm 5,45	1,00

Примечание: –* – достоверные ($p < 0,05$) различия по U-критерию Манна-Уитни по отношению к контролю.

Таблица 5. Ингибирующее действие различных доз биологически активных веществ на культуру гепатоцитов ($M \pm m$, $n=3$)

№№ проб	Доза БАВ, мг.мл ⁻¹	Эффективность прикрепления клеток	Коэффициент пролиферации клеток	Предельная плотность клеток
I	25	0,52 \pm 0,02*	0,49 \pm 0,02*	0,50 \pm 0,02*
II	10	0,65 \pm 0,02*	0,69 \pm 0,03*	0,44 \pm 0,02*
III	5	0,67 \pm 0,03*	0,93 \pm 0,04*	0,51 \pm 0,02*
IV	3	0,95 \pm 0,03	1,14 \pm 0,05	1,09 \pm 0,04
V	Контроль	1,00 \pm 0,06	1,00 \pm 0,05	1,00 \pm 0,05

Примечание: –* – достоверные ($p < 0,05$) различия по U-критерию Манна-Уитни по отношению к контролю.

Обобщающие экспериментальные данные, отражающие ингибирующее действие БАВ в разных концентрациях на клетки крысиных гепатоцитов, представлены в таблице (таб. 5).

ОБСУЖДЕНИЕ

Экспериментально установлено, что через 24 ч после начала опыта, во всех испытуемых пробах наблюдали определенные изменения, выражающиеся в снижении величины коэффици-

ента прикрепления клеток гепатоцитов. Только при использовании метаболитов в концентрации 3 мг·мл⁻¹ средняя концентрация клеток практически не отличалась от контрольных величин. В случае внесения в питательную среду 10 и 20 мг·мл⁻¹ БАВ имело место уменьшение коэффициента прикрепления клеток, что можно объяснить недостаточной приспособляемостью гепатоцитов к этому компоненту, особенно при такой его высокой удельной концентрации.

Таким образом, в результате выполненного комплекса экспериментальных исследований нами была определена оптимальная доза биологически активных веществ, равная $3 \text{ мг} \cdot \text{мл}^{-1}$, стимулирующая рост и развитие клеточной культуры крысиных гепатоцитов.

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

Бактериальный штамм *B. subtilis B-9906* во всех испытуемых концентрациях обладают антагонистическим действием в отношении тест-штаммов микроорганизмов, наиболее часто встречающихся при различных инфекционных процессах. Оптимальная концентрация *B. subtilis* составляла от 1,0 до 3,0 млрд. Дальнейшее увеличение количества живых микробных клеток в составе биокомпонента существенно не влияло на величину его антагонистической активности, которая в целом отражает функционально-метаболический потенциал бактерий в целом.

Биологически активные вещества (метаболиты) штамма *B. subtilis B-9906* обладают выраженным стимулирующим действием на клетки гепатоцитов только в испытуемой пробе IV. Относительные показатели пролиферативной активности в этой группе на протяжении всего эксперимента оставались максимально близкими к контролю (коэффициент прикрепления клеток) или превышали (коэффициенты пролиферации и предельной плотности клеток) аналогичные показатели в контрольной группе.

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.* 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].
3. *Holzappel W. H., Schillinger U.* Introduction to pre- and probiotics. Food Research International 35, 2002, 109–116.
4. *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.
5. *Lee Y. K., Salminen S.* Handbook of Probiotics and Prebiotics. John Wiley and Sons, Ltd., 2009, 132–144.
6. *Russel J., Cohn R.* Probiotics. U.K., Edinburgh: LEN-NEX Corp. 2012, 5–58.
7. *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, 16–51].

DEVELOPMENT OF EXPERIMENTAL SAMPLE OF A NEW HEPATOPROTECTOR

© 2018 N. A. Zabokritskiy

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

Received: 13.05.2018. Accepted: 23.06.2018

The present research is devoted to the design of combined hepatoprotector using culture strain *Bacillus subtilis B-9906* and isolated from the same strain of the metabolic complex. A series of experiments with the use of explanted rat hepatocytes in the modeling of toxic carbon tetrachloride in direct experiments has demonstrated the presence of hepatoprotective action directly in the metabolic complex. The increase in proliferative activity of hepatocyte cell culture was observed after 48 hours, the culture was fully restored after 96 hours.

Key words: probiotic microorganisms, biologically active substances, metabolites, design, hepatoprotective effect

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