

ИММУНОФАРМАКОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ИЗУЧЕНИЯ ИММУНОТРОПНЫХ СВОЙСТВ НОВОГО БИСОЕДИНЕНИЯ

Забокрицкий Н.А.

ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии» Уральского отделения Российской академии наук,
г. Екатеринбург, Россия

Резюме. Настоящая публикация посвящена вопросам экспериментального изучения иммунотропной активности нового соединения – метабиотика, на основе метаболитов (биологически активных веществ, БАВ), продуцируемых сапрофитным и безопасным стандартизированным штаммом ВКПМ *Bacillus subtilis* В-9909. Цель исследования – экспериментальная оценка иммунотропного действия метаболитов, продуцируемых пробиотическими микроорганизмами штамма ВКПМ *Bacillus subtilis* В-9909 на показатели клеточного иммунитета у лабораторных животных при моделировании у них токсического поражения печени. Метаболиты выделяли из культуральной жидкости бактериальной культуры *Bacillus subtilis*, штамм ВКПМ В-9909, при его глубинном культивировании в среде, состоящей из соляно-кислотного гидролизата соевой муки или панкреатического гидролизата казеина. Культура в это время находилась в конце экспоненциальной фазы роста (16-18 часов культивирования). Исследование показателей клеточного статуса у экспериментальных групп животных при оценке терапевтической эффективности экспериментального образца метабиотика, по отношению к группе лабораторных животных, получавших препарат сравнения урсосан, проводили путем определения таких количественных показателей сыворотки крови, как: количественное определение фагоцитарной активности (ФА) нейтрофилов периферической крови; определение метаболической активности нейтрофилов периферической крови в НСТ-тесте; количественное определение Т- и В-лимфоцитов; количество антителообразующих клеток (АОК). Поражение печени изучали путем моделирования острого токсического гепатита у белых крыс. Экспериментальный токсический гепатит моделировали на лабораторных животных – белых крысах. Внутрижелудочно вводили 40%-ный раствор ССl₄ в вазелиновом масле в течение 2 недель из расчета 0,2 г/кг. Полученные результаты экспериментальных исследований свидетельствуют, что об активации фагоцитарной активности нейтрофилов периферической крови в ранние сроки эксперимента, что подтверждается данными, полученными в НСТ-тесте. Одновременно, в ранние сроки эксперимента значительно выросло количественное представление популяций Т- и

Адрес для переписки:

Забокрицкий Николай Александрович
ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии»
Уральского отделения Российской академии наук
620049, Россия, г. Екатеринбург, ул. Первомайская, 106.
Тел.: 8 (922) 110-11-14.
E-mail: pharmusma@rambler.ru

Address for correspondence:

Nikolai A. Zabokritskiy
Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch,
Russian Academy of Sciences
106 Pervomaiskaya St
Yekaterinburg
620049 Russian Federation
Phone: +7 (922) 110-11-14.
E-mail: pharmusma@rambler.ru

Образец цитирования:

Н.А. Забокрицкий «Имунофармакологические аспекты изучения иммунотропных свойств нового биосоединения» // Российский иммунологический журнал, 2023. Т. 26, № 3. С. 259-264.
doi: 10.46235/1028-7221-9643-IAO

© Забокрицкий Н.А., 2023
Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

N.A. Zabokritskiy “Immunopharmacological aspects of studying immunotropic properties of a novel biocompound”, Russian Journal of Immunology/Rossiyskiy Immunologicheskii Zhurnal, 2023, Vol. 26, no. 3, pp. 259-264.
doi: 10.46235/1028-7221-9643-IAO

© Zabokritskiy N.A., 2023
The article can be used under the Creative
Commons Attribution 4.0 License

DOI: 10.46235/1028-7221-9643-IAO

В-лимфоцитов, а также количество АОК, что говорит об активации всех звеньев клеточного иммунитета, в ответ на токсическое воздействие четыреххлористого углерода. Таким образом, проведенные исследования по изучению клеточного статуса лабораторных животных, получавших метаболиты, продуцируемых пробиотическими микроорганизмами рода *Bacillus subtilis* В-9909 на лабораторных животных при моделировании у них токсического поражения, дают основания выдвинуть заключение о наличии у испытуемого образца метабиотика существенного иммуномодулирующего эффекта, в сравнении с урсосаном. Все вышеизложенное позволяет рекомендовать данное соединение, как перспективный лекарственный кандидат нового гепатопротектора с иммуностропным эффектом.

Ключевые слова: *Bacillus subtilis*, метаболиты, пробиотик, гепатопротектор, иммуностропная активность, клеточный иммунитет

IMMUNOPHARMACOLOGICAL ASPECTS OF STUDYING IMMUNOTROPIC PROPERTIES OF A NOVEL BIOCOMPOUND

Zabokritskiy N.A.

Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Yekaterinburg, Russian Federation

Abstract. The article presents an experimental study of immunotropic activity of a new compound, a metabiotic, based on metabolites (biologically active substances) produced by a of saprophytic *Bacillus subtilis* В-9909 strain, being safe for health and standardized at Russian National Collection of Industrial Microorganisms (RNCIM). The aim of our study was to experimentally evaluate the immunotropic effects of metabolites produced by the probiotic *Bacillus subtilis* В-9909 upon the parameters of cellular immunity tested in the animal model of induced toxic liver damage. The metabolites were isolated from the cultural liquid of *Bacillus subtilis* culture (RNCIM strain В-9909) during its deep cultivation in a medium containing hydrochloric acid hydrolyzate of soy flour, or pancreatic hydrolyzate of casein. At 16-18 hours of cultivation, the cells were in the exponential growth phase. The indices of cellular status were studied in experimental groups of animals, when assessing therapeutic efficacy of an experimental metabiotic sample, as compared to a group of laboratory animals treated with the reference drug (ursosan). We assessed the quantitative indicators of blood as follows: determination of phagocytic activity (FA) of peripheral blood neutrophils; measurement of metabolic activity in peripheral blood neutrophils by means of NBT-test; quantitative determination of T and B lymphocytes; the number of antibody-forming cells (AFC). Liver damage was studied in a model of acute toxic hepatitis in albino rats. Experimental toxic hepatitis was induced by 40% solution of CCl₄ in vaseline oil injected intragastrically for 2 weeks at the dose of 0.2 g/kg. The results of experimental studies showed activation of phagocytic activity by peripheral blood neutrophils at the early terms of experiment, being also confirmed by the results of NBT-testing. Moreover, at the early observation terms, a significantly increased representation of T and B lymphocyte populations as well as AFC numbers, were revealed thus suggesting activation of all components of cellular immunity in response to the carbon tetrachloride toxicity. Thus, the reported studies on the cellular status of laboratory animals treated with metabolites produced by probiotic microorganisms of the genus *Bacillus subtilis* (В-9909) on laboratory animals with toxic liver damage allow us to conclude that the test sample of this metabiotic preparation exerts a significant immunomodulatory effect, when compared with ursosan. This evidence allows us to consider this compound a promising candidate drug for a new hepatoprotector with immunotropic effect.

Keywords: *Bacillus subtilis*, metabolites, probiotic, hepatoprotector, immunotropic activity, cellular immunity

Работа выполнена в рамках госзадания ИИФ УрО РАН (тема № 122020900136-4).

Введение

Практическое здравоохранение нуждается в поиске новых эффективных лечебно-профилактических средств в области гастроэнтерологии и иммунологии [1, 3, 4]. На сегодняшний день, одной из актуальных и востребованных фармакологических групп, применяемых при заболеваниях печени и желчевыводящих путей являются гепатопротекторные препараты. Поисковые исследования большинства отечественных и зарубежных авторов свидетельствуют, что в создании подобных препаратов фармакологический приоритет целесообразно отдавать медицинским иммунобиологическим препаратам микробного происхождения с иммуотропной активностью. В связи с этим весьма актуальной является группа пробиотических препаратов, а, в частности, лекарственные кандидаты нового поколения – метабиотики. Так, известно, что в основа метабиотиков представлена биологически активными веществами (БАВ), продуцируемыми пробиотическими микроорганизмами. С точки зрения современной фармакологии и биотехнологии наиболее востребованными продуцентами БАВ являются непатогенные микроорганизмы рода *Bacillus*, которые на сегодняшний день расцениваются как самоэлиминирующиеся антагонисты. Наиболее актуальным в этом плане представляется штамм *Bacillus subtilis*, который обладает значимой антагонистической активностью в отношении широкого спектра патогенных и условно-патогенных микроорганизмов и не чувствительны или малочувствительны к современным химиотерапевтическим препаратам [2, 5, 8]. Автором был получен, выделен, изучен и депонирован штамм ВКПМ *Bacillus subtilis* В-9909, который в более ранних исследованиях проявил гепатопротекторную активность, а также иммуотропное действие в отношении гуморального звена иммунитета.

В связи с этим значительный научный интерес представляют метабиотик, полученный на основе БАВ штамм ВКПМ *Bacillus subtilis* В-9909.

Цель исследования – экспериментальная оценка иммуотропного действия метаболитов, продуцируемых пробиотическими микроорганизмами штамма ВКПМ *Bacillus subtilis* В-9909

на лабораторных животных при моделировании у них токсического поражения печени.

Материалы и методы

В работе использовали биологически активные вещества (метаболиты) микроорганизмов штамма ВКПМ *Bacillus subtilis* В-9909.

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

Метаболиты выделяли из культуральной жидкости бактериальной культуры *Bacillus subtilis*, штамм ВКПМ В-9909, при его глубинном культивировании в среде, состоящей из соляно-кислотного гидролизата соевой муки или панкреатического гидролизата казеина. Культура в это время находилась в конце экспоненциальной фазы роста (16-18 часов культивирования) [3, 7].

Культивирование проводили в 250,0 мл колбах на термостатированной установке выращивания микроорганизмов УВМТ-12-250. Для получения культуральной жидкости в больших объемах использовали ферментер БИОР-0,1.

В последующем культуральную жидкость подвергали следующим технологическим операциям:

- центрифугированию (8000 об/мин в течение 15 минут) или при больших объемах культуральной жидкости сепарированию (для отделения клеточной массы) с использованием сепаратора АСГ-3МБ;
- ультразвуковой дезинтеграции (для разрушения оставшихся бактериальных клеток *Bacillus subtilis*) для чего использовали ультразвуковой диспергатор УЗД2-0,1/22 [2, 6, 7];
- стерилизующей ультрафильтрации с использованием мембранных фильтров Millipore с диаметром пор 0,22 мкм и Sartorius с диаметром пор 0,3 мкм;
- лиофильному высушиванию (до уровня остаточной влажности 3-5%) на лабораторной установке сублимационной сушки ЛСС-2. Выход лиофильно высушенного комплекса БАВ, освобожденного от клеточной биомассы (из 1 л фугатной жидкости), составлял – 10-15 г.

Качественное и количественное содержание метаболитов определяли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. Разделение проводили при комнатной температуре с ис-

пользованием колонки Supelcosil™ LC-18 (250 × 4,6 мм, размер частиц 5 мкм).

Поражение печени у белых лабораторных крыс изучали путем моделирования острого токсического гепатита.

Экспериментальный токсический гепатит моделировали путем внутрижелудочного введения 40%-ного раствора CCl₄ в вазелиновом масле в течение 2 недель из расчета 0,2 г/кг.

В исследовании было выделено четыре исследуемые группы по 12 лабораторных крыс в каждой:

I – группа животных, которым назначили исследуемый метабиотик;

II – группа животных, которым назначили препарат сравнения урсосан;

III – контроль (без лечения);

IV – контроль интактные.

Для оценки показателей клеточного иммунного статуса у лабораторных животных при применении экспериментального образца метаболитов в условиях моделирования острого токсического гепатита исследовали следующие показатели:

– количественное определение фагоцитарной активности (ФА) нейтрофилов периферической крови, опт. ед.;

– определение метаболической активности нейтрофилов периферической крови в НСТ-тесте, опт. ед.;

– количественное определение Т- и В-лимфоцитов методом Е-розетко-образования, 10⁶/см³;

– количество антителообразующих клеток (АОК), 10⁶/см³.

Результаты статистически анализировались с использованием пакетов компьютерных программ Microsoft Office Excel 2010 и Statistica 12.0. При этом был использован метод дисперсионного анализа (ANOVA). Оценивали нормальность распределения полученных данных по методу Колмогорова–Смирнова. Статистическую оценку достоверности межгрупповых различий проводили с использованием параметрического критерия Фишера в зависимости от нормальности распределения данных. Оценку статистических гипотез выполняли при критическом уровне значимости $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Полученные экспериментальные данные изменения показателей клеточных факторов иммунитета белых лабораторных крыс при мо-

делировании острого токсического гепатита свидетельствуют о том, что на 3-и сутки эксперимента в группе IV подопытных животных с воспроизведенной моделью острого токсического гепатита, по сравнению с III (контрольной) группой животных, отмечается существенное повышение всех изучаемых показателей клеточных факторов иммунитета. Так, фагоцитарная активность нейтрофилов периферической крови возросла более, чем в 4 раза – $65,2 \pm 0,48$ опт. ед., поглотительная способность нейтрофилов в НСТ-тесте увеличилась в 2,5 раза – $0,09 \pm 0,02$ опт. ед., увеличилось количество Т- и В-лимфоцитов в 2 раза – $0,43 \pm 0,05 \times 10^6/\text{см}^3$ и $0,35 \pm 0,04 \times 10^6/\text{см}^3$, количество АОК в 2,4 раза – $0,153 \pm 0,021 \times 10^6/\text{см}^3$, соответственно.

В I и II группах подопытных животных, получавших экспериментальный образец метабиотика и препарат сравнения урсосан, по сравнению с III (контрольной), отмечается более выраженное увеличение всех изучаемых клеточных факторов иммунитета – повышение фагоцитарной активности нейтрофилов крови в 5,2 и 4,6 раза, поглотительной способности нейтрофилов в НСТ-тесте в 8 и 6 раз, увеличение количества Т- и В-лимфоцитов в 2,3 и 2,1 раз, а также увеличение количества АОК в 1,5 раза в обеих группах соответственно.

Кроме того, на 8-е сутки эксперимента наблюдалось увеличение количества АОК и, соответственно, Т- и В-лимфоцитов. Фагоцитарная активность и поглотительная способность нейтрофилов крови оставалась на прежнем уровне.

На 14-е и 28-е сутки наблюдения отмечали положительную динамику изменения показателей клеточного иммунитета, в большей степени выраженную в I группе подопытных животных, получавших экспериментальный образец метабиотика, чем во II группе подопытных животных, которым вводили препарат сравнения урсосан.

Заключение

Полученные экспериментальные данные показателей факторов клеточного иммунитета позволяют судить об активации фагоцитарной активности нейтрофилов периферической крови в ранние сроки эксперимента, что подтверждается данными, полученными в НСТ-тесте. Одновременно, в ранние сроки эксперимента значитель-

но выросло количественное представление популяций Т- и В-лимфоцитов, а также количество АОК, что говорит об активации всех звеньев клеточного иммунитета, в ответ на токсическое воздействие четыреххлористого углерода.

Таким образом, проведенные исследования по изучению клеточного статуса лабораторных

животных, получавших метаболиты, продуцируемых пробиотическими микроорганизмами рода *Bacillus* при моделировании у них токсического поражения, дают основания выполнить заключение о наличии у испытуемого образца метабиотика (БАВ) существенного иммуномодулирующего эффекта, в сравнении с уросаном.

Список литературы / References

1. Ардатская М.Д., Столярова Л.Г., Архипова Е.В., Филимонова О.Ю. Метабиотики как естественное развитие пробиотической концепции // Рецепт, 2019. Т. 2, № 22. С. 291-298. [Ardatskaya M.D., Stolyarova L.G., Arkhipova E.V., Filimonova O.Yu. Metabiotics as a natural development of a probiotic concept. *Retsept = Recipe*, 2019, Vol. 2, no. 22, pp. 291-298. (In Russ.)]
2. Забокрицкий Н.А. Оценка иммуностропного действия пробиотика бацилакт в составе трансдермальных терапевтических систем // Российский иммунологический журнал, 2017. Т. 11, № 2 (20). С. 126-129. [Zabokritskiy N.A. Preclinical evaluation of immunotropic action of probiotics bacilact transdermal therapeutic system. *Rossiyskiy immunologicheskiy zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2017, Vol. 11, no. 2 (20), pp. 126-129. (In Russ.)]
3. Забокрицкий Н.А. Принципиальные направления научных исследований по обоснованию и разработке новых иммунобиологических препаратов // Экспериментальная и клиническая фармакология, 2018. Т. 81. С. 85-86. [Zabokritskiy N.A. Principal directions of scientific research on the justification and development of new immunobiological drugs. *Ekspperimentalnaya i klinicheskaya farmakologiya = Russian Journal of Experimental and Clinical Pharmacology*, 2018, Vol. 81, pp. 85-86. (In Russ.)]
4. Забокрицкий Н.А., Сарапульцев П.А. Экспериментальное обоснование возможности создания нового метаболитического препарата // Российский иммунологический журнал, 2018. Т. 3, № 12. С. 295-300. [Zabokritskiy N.A., Sarapultsev P.A. Experimental justification of the possibility of creating the new metabolic drug. *Rossiyskiy immunologicheskiy zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2018, Vol. 3, no. 12, pp. 295-300. (In Russ.)]
5. Забокрицкий Н.А. Фармакологическая оценка иммуностропной активности нового гелевого метабиотика на факторы клеточного и гуморального иммунитета при экспериментальном моделировании термических ожогов кожи // Российский иммунологический журнал, 2020. Т. 23, № 2. С. 125-132. [Zabokritskiy N.A. Pharmacological assessment of immunotropic activity of new gel metabiotic on cellular and humoral immunity in experimental modeled thermal skin burns. *Rossiyskiy immunologicheskiy zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2020, Vol. 23, no. 2, 125-132. (In Russ.)]
6. Забокрицкий Н.А. Изучение цитопротекторных свойств метаболитов штамма *Bacillus subtilis* В-9909 на культуре выделенных гепатоцитов // Вестник уральской медицинской академической науки, 2022. Т. 19, № 3. С. 203-209. [Zabokritskiy N.A. Experimental evaluation of the cytoprotective effect of probiotic metabolites of *Bacillus subtilis* В-9909 strain on the culture of isolated hepatocytes. *Vestnik uralskoy medicinskoj akademicheskoy nauki = Journal of Ural Medical Academic Science*, 2022, Vol. 19, no. 3, pp. 125-132. (In Russ.)]
7. Лабинская А.С., Блинкова Л.П., Ещина А.С., Булаева Г.В., Вертиев Ю.В., Винокуров А.Е., Горобец О.Б., Дарбева О.С., Жиленков Е.Л., Зверьков Д.А., Иванова С.М., Иванова Т.С., Корн М.Я., Кривопалова Н.С., Лукин И.Н., Мельникова В.А., Нехорошева А.Г., Романова Ю.М., Сидоренко С.В., Скаженник В.Ю., Скала Л.З., Трухина Г.М. Общая и санитарная микробиология с техникой микробиологических исследований. СПб.: Лань, 2016. 588 с. [Labinskaya A.S., Blinkova L.P., Eshina A.S., Bulaeva G.V., Vertiev Yu.V., Vinokurov A.E., Gorobets O.B., Darbeeva O.S., Zhilenkov E.L., Zverkov D.A., Ivanova S.M., Ivanova T.S., Korn M.Ya., Krivopalova N.S., Lukin I.N., Melnikova V.A., Nekhorosheva A.G., Romanova Yu.M., Sidorenko S.V., Skazenik V.Yu.,

Skala L.Z., Trukhina G.M. General and Sanitary Microbiology with the Technique of microbiological research]. St. Petersburg: Lan, 2016. 588 p.

8. Lee N.K., Paik H.D., Kim W.S. Bacillus strains as human probiotics: characterization, safety, microbiome, and probiotic carrier. *Food Sci. Biotechnol.*, 2019, Vol. 28, no. 5, pp. 1297-1305.

Автор:

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

Author:

Zabokritskiy N.A., PhD, MD (Medicine), Associate Professor, Senior Research Associate, Laboratory of Immunophysiology and Immunopharmacology, Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Yekaterinburg, Russian Federation

Поступила 14.05.2023
Принята к печати 29.06.2023

Received 14.05.2023
Accepted 29.06.2023