

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ОЦЕНКА ЦИТОПРОТЕКТОРНОГО ДЕЙСТВИЯ ПРОБИОТИЧЕСКИХ МЕТАБОЛИТОВ И КРИТЕРИИ ОТБОРА ШТАММОВ *BACILLUS SUBTILIS* ДЛЯ КОНСТРУИРОВАНИЯ НОВОГО ИММУНОТРОПНОГО БИОГЕПАТОПРОТЕКТОРА

Забокрицкий Н.А.

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

Резюме. Настоящая работа посвящена изучению цитопротекторного действия БАВ (метаболитов, продуцируемых пробиотическими микроорганизмами рода *Bacillus*) стерильного фугата культуры пробиотических микроорганизмов ВКПМ *Bacillus subtilis* B-3679 (штамм является продуцентом биоспорицина) на культуру выделенных гепатоцитов при моделировании у них токсического поражения. Получение стерильного фугата культуры ВКПМ *Bacillus subtilis* B-3679 проводили путем стерилизующей фильтрации культуральной жидкости данного штамма. Работа проводилась с использованием перевиваемой линии клеточной культуры Л-41, позволяющая оценивать токсичность различных субстратов на культурах клеток и выдерживающая токсическое воздействие в разных концентрациях. На первом этапе исследований, для решения поставленных задач, были определены максимальная нетоксическая доза стерильного фугата и минимальная токсическая доза СС14 по отношению к клеткам культуры Л-41. На следующем этапе исследований было изучено и доказано цитопротекторное действие БАВ, входящих в состав фугата штамма *Bacillus subtilis* B-3679 по отношению к клеткам линии Л-41. На модели токсического поражения культуры выделенных гепатоцитов было продемонстрировано цитопротекторное и регенеративное действия БАВ в составе фугата штамма *Bacillus subtilis* B-3679. В доклинических исследованиях по оценке токсичности и безопасности экспериментального образца нового биогепаптопротектора на экспериментальных животных было установлено, что комплекс биологически активных веществ (метаболитов), вводимый внутривентрикулярно и интрабрюшинно, является нетоксичным и безопасным для лабораторных животных и не вызывает у них каких-либо патологических изменений во внутренних органах и тканях. Основой нового биогепаптопротектора, обладающего полифункциональным механизмом действия, позволяющего эффективно восстанавливать угнетенные функции печени, с одновременной нормализацией иммунологических показателей, является входящий в его состав активный биокомпонент – метаболиты пробиотических спорообразующих бактерий, которые при введении в организм продуцируют комплекс биологически активных метаболитов (антибиотики, протеолитические, амилаолитические и др. ферменты, иммуноглобулины, а также интерлейкины, витамины, протеины, аминокислоты и другие биоактивные ве-

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:

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

Образец цитирования:

Н.А. Забокрицкий «Экспериментальная оценка цитопротекторного действия пробиотических метаболитов и критерии отбора штаммов *Bacillus subtilis* для конструирования нового иммунотропного биогепаптопротектора» // Российский иммунологический журнал, 2021. Т. 24, № 2. С. 167-174.
doi: 10.46235/1028-7221-990-ЕЕО

© Забокрицкий Н.А., 2021

For citation:

N.A. Zabokritskiy “Experimental evaluation of cytoprotective effect of probiotic metabolites and selection criteria of *Bacillus subtilis* strains for development of new immunotropic biohepatoprotector”, Russian Journal of Immunology/ Rossiyskiy Immunologicheskii Zhurnal, 2021, Vol. 24, no. 2, pp. 167-174.
doi: 10.46235/1028-7221-990-ЕЕО

DOI: 10.46235/1028-7221-990-ЕЕО

щества). Экспериментально установленное цитопротекторное действие комплекса БАВ, входящих в состав фугата культуры бактерий штамма *Bacillus subtilis B-3679*, позволит в дальнейшем обоснованно разрабатывать новые перспективные медицинские иммунобиологические препараты, обладающие защитным действием в отношении органов и тканей человека.

Таким образом, в результате проведенных исследований установлено, что БАВ в составе фугата штамма *Bacillus subtilis B-3679* не только обладают выраженным цитопротекторным действием, но и положительно влияют на регенеративные способности клеток печени, что является значимым фактором для дальнейшего использования данного штамма в качестве биоконпонента нового иммуно-тропного биогепа-топротектора.

Ключевые слова: метаболиты, цитопротектор, пробиотические микроорганизмы, клеточные культуры, гепатоциты

EXPERIMENTAL EVALUATION OF CYTOPROTECTIVE EFFECT OF PROBIOTIC METABOLITES AND SELECTION CRITERIA OF *BACILLUS SUBTILIS* STRAINS FOR DEVELOPMENT OF NEW IMMUNOTROPIC BIOHEPATOPROTECTOR

Zabokritskiy N.A.

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

Abstract. The present work concerns a study of cytoprotective effect of biologically active substances (BAS) produced by probiotic microorganisms from the *Bacillus* genus. These substances were obtained from a sterile fugate of probiotic *Bacillus subtilis* VKPM *B-3679* culture (a biosporicin-producing strain) and added to the culture of isolated hepatocytes, when modeling their in vitro toxic damage. Sterile buffered culture of *Bacillus subtilis B-3679* was prepared by sterilizing filtration of the culture supernatant of this strain. The work was carried out using a passageable L-41 cell culture strain, which allows to assess toxicity of various substrates upon cell cultures and protection against toxic effects at different concentrations. At the first stage of study, the maximal non-toxic dose of sterile fugate and the minimal toxic dose of CCl₄ established for the cultured L-41 cells. At the next stage, cytoprotective effect of BAS originating from the of *B. subtilis B-3679* strain fugate, was studied and tested with L-41 cell line. Cytoprotective and regenerative effects of BAS containing in the fugate of *B. subtilis B-3679* strain were demonstrated in the model of toxic damage using the culture of isolated hepatocytes. In preclinical studies, to assess the toxicity and safety of the experimental sample of a new biohepatoprotector for experimental animals, we have found that the complex of biologically active substances (metabolites) is non-toxic and safe for laboratory animals when administered intragastrically and intraperitoneally, and it does not cause any pathological changes in their internal organs and tissues. The basis of the new biohepatoprotection effect, which may provide a multifunctional action, allowing to effectively restore depressed liver functions, with simultaneous normalization of immunological parameters, is its active biocomponent, i.e., metabolites of probiotic spore-forming bacteria, which, when if brought to the body, produce a complex of biologically active metabolites (antibiotics, proteolytic, amylolytic, and other enzymes, immunoglobulins, as well as interleukins, vitamins, proteins, amino acids, and others bioactive substances). Due to experimentally established cytoprotective effect of the complex of BAS, the components of fugate culture of *B. subtilis* strain *B-3679*, will allow us to develop new promising medical immunobiological drugs that may provide a protective effect on human organs and tissues. As a result it was found that BAS, as components of fugate from *B. subtilis B-3679* strain show both a pronounced cytoprotective effect, and a positive action upon regenerative abilities of liver cells, which is a significant factor for the future use of this strain as a biocomponent of a new immunotropic biohepatoprotector.

Keywords: metabolites, cytoprotector, probiotic microorganisms, cell culture, hepatocytes

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

Введение

На сегодняшний день разработка новых лекарственных кандидатов, изучение специфических фармакологических механизмов их действия на различных биологических моделях, экстраполяции фармакологических показателей на человека, доклинического изучения безопасности созданных экспериментальных образцов являются весьма актуальной задачей современного здравоохранения.

Оценивая сложившуюся к настоящему времени экологическую обстановку в нашей стране, можно констатировать, что загрязнения токсичными химическими веществами регистрируются на всей территории России. Стойкие органические загрязнители, такие как полициклические ароматические углеводороды, полихлорированные дифенилы, диоксины, фураны, ряд пестицидов определяются в окружающей среде почти практически повсеместно.

Воздействия на организм человека неблагоприятных экологических, климатогеографических, социальных (алкоголизация населения, бытовые отравления и др.) и профессиональных факторов, а также неблагоприятная эпидемиологическая обстановка могут приводить к нарушению функций ряда систем, органов и тканей макроорганизма, что обуславливает, в конечном итоге, рост заболеваемости и смертности среди населения Российской Федерации. Как правило, в патогенезе различных нозологических единиц важная роль отводится повреждению клеточных элементов тканей.

В последнее десятилетие существенно возрос интерес как ученых, так и практических врачей к пробиотическим препаратам. Значительно расширилось их применение, успешно разрабатываются оригинальные композиции и лекарственные формы пробиотиков, расширяется их производство, исследуются новые, перспективные области применения данных препаратов [1, 3, 5].

Все более широко в лечебную практику внедряются новые пробиотики на основе аэробных спорообразующих бацилл (биоспорин, споробактерин, бактисубтил и др.), но до последнего времени, по данным литературы, не рассматривалось цитопротекторное действие пробиотических спорообразующих бактерий [2, 4, 7].

В связи с этим представляет значительный интерес изучение цитопротекторного действия комплекса биологически активных веществ (БАВ),

продуцируемых пробиотическими бациллами рода *Bacillus* [7].

Цель исследования — оценка цитопротекторного действия БАВ (метаболитов, продуцируемых пробиотическими микроорганизмами рода *Bacillus*) стерильного фугата культуры пробиотических микроорганизмов ВКПМ *Bacillus subtilis* В-3679 на культуру выделенных гепатоцитов при моделировании у них токсического поражения.

Материалы и методы

В работе использовали микроорганизмы штамма ВКПМ *Bacillus subtilis* В-3679.

Паспортные характеристики штамма:

Штамм ВКПМ *Bacillus subtilis* В-3679 депонирован в БРЦ ВКПМ.

Клетки — аэробные грамположительные палочки. На питательных средах клеточная культура растет обильно, образуя через сутки большие, до 15–20 мм в диаметре, желтовато-бежевые шероховатые колонии с выростами, край колонии волнистый, колонии в агар не врастают, легко снимаются петлей. На жидких средах культура клеток образует плотную пленку с ярко выраженной складчатостью, бульон в течение всего срока культивирования остается прозрачным, при встряхивании пленка плохо разбивается.

В мазках из суточной культуры, выращенной на среде Гаузе 2, обнаруживаются прямые палочковидные клетки размером 2,1–2,3 × 0,9–1,2 мкм, располагающиеся одиночно или в виде коротких цепочек. Клетки подвижные, содержат центрально расположенные споры овальной формы. При спорообразовании клетки не раздуваются.

Культура не растет в анаэробных условиях. Диапазон рН для роста — 6,5–7,5, оптимальная температура — 32 °С. Продуцирует каталазу, реакция Фогеса–Проскауэра положительная, хорошо растет в присутствии 7% NaCl. Гидролизует аррорут крахмал, казеин, желатину разжижает медленно, не разлагает мочевины, не образует сероводород и индол. Нитраты восстанавливает, цитрат натрия не утилизирует. Ферментирует с образованием кислоты без газа глюкозу, сахарозу, фруктозу. Галактозу и мальтозу не использует. Не обладает лецитиназной и коагулазной активностью, не нуждается для роста в аминокислотах и витаминах.

Культура обладает выраженной ферментативной активностью, характеризуется высокой антагонистической активностью по отношению к патогенным и условно-патогенным микроорганизмам. Антагонистические свойства штамма, выявленные с помощью метода перпендикулярных штрихов на агаризированной среде Гаузе 2, в отношении тест-культур составляют: *E. coli* — 6–8

мм, *S. typhimurium* – 8–10 мм, *S. aureus* – 13–16 мм, *P. aeruginosa* – 6–8 мм, *C. albicans* – 5–10 мм.

Штамм является продуцентом биоспорицина. Не является генетически модифицированным. Согласно классификации микроорганизмов, приведенных в Санитарных правилах СП 1.2.731-99, штамм относится к микроорганизмам, не патогенным для человека, и поэтому работа со штаммом требует специальных мер предосторожности.

Характеристики указанного штамма в процессе культивирования и хранения не изменяются и в полной мере соответствуют показателям, описанным в паспорте на данный штамм.

Работа проводилась также с использованием перевиваемой линии клеточной культуры Л-41 КД/84 (Авторское свидетельство 3981708/28-13/159566; ФС-42-3724-99, рег. № до по РЛС – 94/161/171), находящейся на хранении в музейной коллекции соматических клеток человека и животных ЕНИИВИ.

В работе использовали фугат, полученный путем стерилизующей фильтрации культуральной жидкости штамма пробиотических микроорганизмов *B. subtilis B-3679*.

Получение стерильного фугата культуры *B. subtilis B-3679* проводили путем стерилизующей фильтрации культуральной жидкости данного штамма.

Культивирование штамма *B. subtilis B-3679* осуществляли глубинным способом на качалке (220 об/мин⁻¹ рядом при 37 °С) в течение 30 ч. При этом готовили посевной материал в концентрации 1×10^6 кл·см⁻³. В колбы объемом 100,0 см³ вносили по 20,0–25,0 см³ питательной среды, после чего добавляли посевной материал в указанной дозе и помещали на качалку [6].

По окончании цикла глубинного культивирования содержимое всех колб сливали в одну емкость, определяли концентрацию КОЕ (БК) в 1,0 см³ культуральной жидкости и помещали в холодильник на 24 ч (4±2 °С).

Перед этапом стерилизующей фильтрации проводили центрифугирование культуральной жидкости на центрифуге ОПН-3 при 3000 об/мин⁻¹ в течение 10 мин.

Для получения стерильного фугата монтировали системы для фильтрации и стерилизовали их в автоклаве в стандартном режиме. Вакуумную фильтрацию осуществляли последовательно, через целлюлозные фильтры (d = 11 мкм, 0,30 мкм и 0,22 мкм). Стерильность полученного фильтрата проверяли путем высева 0,1 см³ на тигмоколевую среду и среду 199. Срок наблюдения составлял 5 суток. Полученный фугат считали стерильным, если по окончании срока наблюде-

ния не наблюдался рост микрофлоры в туказанных средах (замутнение во флаконах) [5].

Гепатоциты получали из печени мышей-сусунков, которых умерщвляли путем шейной цервикальной шейных позвонков. Печень диспергировали в смеси равных объемов растворов трипсина и Версена. Суспензию клеток вносили в пенициллиновые флаконы и культивировали в среде «Игла» с двойной концентрацией аминокислот, витаминов и 20%-ной бычьей сывороткой. Выделенные (эксплантированные) гепатоциты в количестве $(5-8) \times 10^6$ кл/см⁻³ инкубировали в течение 96 ч в криостате термостате при (37±1) °С. Монослой гепатоцитов на стенках пенициллиновых флаконов был представлен в виде тонкой, белесоватого цвета пленки, плотно прилегающей к стеклу. Микроскопически гепатоциты хорошо распластаны на стекле, плотно прилегают друг к другу, имеют веретенообразную форму, четкие границы и ядро по центру клетки, группы клеток образуют однонаправленные тяжи.

Токсичность исследуемых опытов проб оценивали *in vitro* по изменению пролиферативной активности клеток культуры Л-41. Методика определения токсичности основана на установлении различий между интенсивностью прироста числа клеток культуры Л-41 на разных сроках наблюдения (24, 72 и 96 ч) [4, 6].

Пролиферативную активность клеток культуры Л-41 оценивали по следующим 3 показателям:

- коэффициент эффективности прикрепления клеток, который рассчитывали по отношению количества клеток в культуре через 24 ч к «посадочной дозе» клеток;
- коэффициент пролиферации рассчитывали по отношению количества клеток через 72 ч к количеству клеток через 24 ч;
- определяли предельную плотность клеточной популяции, которую рассчитывали отношением количества клеток в испытуемой пробе к количеству клеток в контрольной пробе через 96 ч после начала опыта.

Критерием проявления минимального токсического действия считали снижение более чем на 20% величины как минимум одного из трех показателей пролиферативной активности испытуемых проб по сравнению с контролем.

Максимальную нетоксическую дозу определяли также по сравнению показателей пролиферативной активности в испытуемых пробах и в контроле. Критерием проявления максимального нетоксического действия считали снижение не более чем на 20% величин определяемых показателей пролиферации в опытных группах, по сравнению с контролем.

Непосредственно перед выполнением анализа готовили рабочую клеточную культуру Л-41. Количество клеток подсчитывали в камере Горяева при микроскопии в 3 повторностях. Из трех полученных результатов подсчета клеток рассчитывали среднее арифметическое значение, которое принимали за среднюю концентрацию клеток в рабочей культуре. Количество клеток в рабочей клеточной культуре доводили до $(4-5) \times 10^4$ кл/см³.

Для проведения одного анализа в 10 пенициллиновых флаконов вносили по 2,0 см³ взвеси рабочей клеточной культуры и добавляли в каждый флакон по 0,11 см³ исследуемой опытной пробы. Одновременно готовили 10 пенициллиновых флаконов для контрольных проб, в которые помещали по 2,0 см³ рабочей клеточной цивилизации культуры и по 0,11 см³ стерильной дистиллированной воды. Все флаконы с опытными и контрольными пробами инкубировали в термостате при термоустойчивых температуре $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$.

Через 24, 72 и 96 ч из каждого трех флаконов опытных и контрольных проб сливали ростовую среду (среда «Игла» и среда 199, в равных пропорциях, с добавлением 20%-ной сыворотки крови крупного рогатого скота) и добавляли во флаконы до по 2,0 см³ раствора Версена. Далее пробы выдерживали в термостате при температуре $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ 15-25 мин, после чего проводили ресуспендирование путем интенсивного встряхивания в течение 1 мин. Подсчет количества клеток проводили в камере Горяева для каждой из шести (трех опытных и трех контрольных) проб не менее трех раз. Вычисляли средние величины концентрации клеток в 1,0 см³ ростовой среды.

Для исследования цитопротекторного действия стерильного фугата штамма *B. subtilis* В-3679 по отношению к клеточной тест-системе (популяция клеток Л-41), с воспроизведенной моделью токсического поражения, вводили однократную и от однократной максимальные нетоксические дозы.

Токсическое поражение популяции клеток линии Л-41 осуществляли путем введения в пенициллиновые флаконы однократной и двукратной минимальных токсических доз СС14.

Цитопротекторную эффективность стерильного фугата в условиях моделирования токсического поражения выделенных гепатоцитов определяли по изменению плотности монослоя клеток. Регенеративную способность выделенных гепатоцитов определяли по изменению митотического индекса. Клетки культивировали на покровных стеклах в чашках Петри. После образования монослоя в культуральную среду

добавляли СС14 в концентрации однократной и двукратной минимальной токсической дозы. В течение опыта (через 24, 72 и 96 ч) клетки фиксировали и окрашивали гематоксилином-эозином. Для определения митотического индекса подсчитывали количество митозов в 800-1000 клетках на 1 покровное стекло. В каждом препарате просчитывали 20 полей зрения, в трех повторностях. Изменение плотности монослоя определяли по изменению среднего числа клеток в поле зрения микроскопа.

Для исследования цитопротекторного действия БАВ стерильного фугата штамма *B. subtilis* В-3679 в клеточную тест-систему, представленную популяцией выделенных гепатоцитов, с воспроизведенной моделью токсического поражения вводили однократную и от максимальной нетоксической дозы.

Воспроизведение токсического поражения популяции гепатоцитов осуществляли путем введения в пенициллиновые флаконы однократной и двукратной минимальных токсических доз СС14.

Общая продолжительность наблюдения за пролиферативной активностью выделенных гепатоцитов после введения СС14 и стерильного фугата составляла 96 ч.

Морфологические изменения клеток изучали в световом микроскопе на живых культурах и окрашенных препаратах.

Статистическую обработку осуществляли с помощью пакетов компьютерных программ Microsoft Office Excel 2010 и Statistica 6.0. Использовали метод дисперсионного анализа (ANOVA). Оценку нормальности распределения полученных данных проводили по методу Колмогорова–Смирнова. Для оценки достоверности межгрупповых различий использовали параметрический F-критерий Фишера в зависимости от нормальности распределения данных. Проверку статистических гипотез осуществляли при критическом уровне значимости $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

На данном этапе изучали цитопротекторное действие стерильного фугата штамма *B. subtilis* В-3679 на клетки линии Л-41 в условиях моделирования токсического (СС14) поражения клеточной популяции.

Для исследования цитопротекторного действия стерильного фугата штамма *B. subtilis* В-3679 по отношению к клеточной тест-системе (популяция клеток Л-41), с воспроизведенной моделью токсического поражения, вводили однократную и от однократной максимальные нетоксические дозы.

Воспроизведение токсического поражения популяции клеток линии Л-41 осуществляли путем введения в пенициллиновые флаконы однократной и двукратной минимальных токсических доз СС14.

В соответствии с вышеприведенной схемой эксперимента формировали следующие испытуемые пробы:

– I(C) проба – клетки линии Л-41 с добавлением двукратной минимальной токсической дозы СС14 и максимальной нетоксической дозы стерильного фугата;

– II(C) проба – клетки линии Л-41 с добавлением двукратной минимальной токсической дозы СС14 и максимальной нетоксической дозы стерильного фугата;

– III(C) проба – клетки линии Л-41 с добавлением минимальной токсической дозы СС14 и максимальной нетоксической дозы стерильного фугата;

– IV(C) проба – клетки линии Л-41 с добавлением минимальной токсической дозы СС14 и максимальной нетоксической дозы стерильного фугата;

– V(C) проба (контрольная) – клетки линии Л-41 с добавлением равного количества дистиллированной воды.

Результаты исследования пролиферативной активности в опытных и контрольной пробах через 24 ч свидетельствуют, что происходит снижение пролиферативной активности в большей степени проявляется в испытуемых пробах I(C), II(C) и в меньшей степени в пробах III(C) и IV(C), коэффициент прикрепления 0,58, 0,74 и 0,91, 0,98 соответственно.

Таким образом, было показано, что на эти сроки наблюдения более выраженным цитопротекторным действием обладает стерильный фугат штамма *B. subtilis B-3679* в дозе максимальной нетоксической, при одновременном введении минимальной токсической дозы СС14 (испытуемая проба IV(C)).

Результаты исследования пролиферативной активности в опытных и контрольной пробах через 72 ч после начала эксперимента свидетельствуют о том, что пролиферативная активность в большей степени проявлялась в испытуемых пробах III(C) и IV(C), в которых моделирование токсического поражения клеток Л-41 достигалось введением однократной минимальной токсической дозы СС14 (коэффициент пролиферации 1,04 и 1,17 соответственно), по сравнению с контрольной пробой V(C) (коэффициент пролиферации 1,00). В пробах I(C) и II(C) отмечали тенденцию к выравниванию пролиферации клеток Л-41, что выражалось в достаточно высоких

величинах коэффициента пролиферации (0,93 и 0,99 соответственно).

Результаты исследования пролиферативной активности в опытных и контрольной пробах через 96 ч показывают, что после начала эксперимента, происходит выравнивание относительной предельной плотности культуры клеток Л-41 во всех пробах. Причем количество клеток в пробах III(C) и IV(C) было выше, чем в контрольной пробе V(C) – предельная плотность относительно контроля 1,04, 1,09 и 1,00 соответственно.

Полученные обобщающие экспериментальные данные, отражающие эффективность цитопротекторного действия стерильного фугата в условиях моделирования токсического поражения перевиваемой клеточной культуры Л-41, свидетельствуют, что в испытуемых пробах I(C) и II(C), в которых моделировали токсическое поражение клеток Л-41 путем добавления двойной минимальной токсической дозы СС14, наблюдается значительное угнетение пролиферативной активности на ранних сроках эксперимента, с последующим ее восстановлением в более поздние сроки.

В пробах III(C) и IV(C) на ранние сроки эксперимента наблюдали незначительное снижение пролиферативной активности клеток Л-41, а на 72 ч наблюдения увеличение коэффициента пролиферации до 1,04 и 1,17 соответственно. Через 96 ч наблюдения отмечали в пробах III(C) и IV(C) увеличение предельной плотности клеточной популяции относительно контроля. Причем необходимо отметить, что потенцирование пролиферативной активности клеток Л-41 было более выражено в пробе IV(C), что объясняется не только цитопротекторным эффектом минимальной нетоксической дозы фугата штамма *B. subtilis B-3679*, но также и возможным регенеративным действием, что требует дальнейшего изучения.

На первом этапе, для решения поставленных задач, были определены максимальная нетоксическая доза стерильного фугата и минимальная токсическая доза СС14 по отношению к клеткам культуры Л-41.

На следующем этапе исследований было изучено и доказано цитопротекторное действие БАВ, входящих в состав фугата штамма *B. subtilis B-3679* по отношению к клеткам линии Л-41.

На модели токсического поражения культуры выделенных гепатоцитов было показано цитопротекторное и регенеративное действия БАВ в составе фугата штамма *B. subtilis B-3679*.

Таким образом, в результате проведенных исследований установлено, что БАВ (метаболиты) в составе фугата штамма *B. subtilis B-3679* не только обладают выраженным цитопротекторным дей-

ствием, но и положительно влияют на регенеративные способности клеток печени, что является значимым фактором для дальнейшего перспективного использования данного штамма в качестве биокомпонента нового лечебно-профилактического препарата.

Заключение

Проведены исследования по оценке цитопротекторного действия БАВ, входящих в состав стерильного фугата, полученного из культуральной жидкости штамма *B. subtilis* B-3679, являющегося активным биокомпонентом экспериментального

образца нового гепатопротекторного препарата. Экспериментально обоснованы минимальная токсическая доза СС14 (500 мкл • см-3) и максимальная нетоксическая доза стерильного фугата штамма *B. subtilis* B-3679 (0,1 %).

Таким образом, полученные результаты по изучению защитного действия комплекса БАВ стерильного фугата культуры пробиотических бактерий рода *Bacillus* на линию перевиваемых клеток Л-41 и выделенных гепатоцитов свидетельствуют об их выраженном цитопротекторном и регенеративном действии, что делает штамм *B. subtilis* B-3679 перспективным для конструирования нового биогепапротектора.

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 иммуотропного действия пробиотика бацилакт в составе трансдермальных терапевтических систем // Российский иммунологический журнал, 2017. Т. 11, № 2. 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, 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, № 5. С. 85-86. [Zabokritskiy N.A. Principal directions of scientific research on the justification and development of new immunobiological drugs. *Eksperimental'naya i klinicheskaya farmakologiya = Russian Journal of Experimental and Clinical Pharmacology*, 2018, Vol. 81, no. 5, pp. 85-86. (In Russ.)]
4. Забокрицкий Н.А., Сарапульцев П.А. Экспериментальное обоснование возможности создания нового метаболитического препарата // Российский иммунологический журнал, 2018. Т. 12, № 3. 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. 12, no. 3, pp. 295-300. (In Russ.)]
5. Забокрицкий Н.А. Фармакологическая оценка иммуотропной активности нового гелевого метаболитика 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, pp. 125-132. (In Russ.)]
6. Лабинская А.С., Блинкова Л.П., Ещина А.С., Булаева Г.В., Вертиев Ю.В., Винокуров А.Е., Горобец О.Б., Дарбеева 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., Скаженик 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., Nekorosheva A.G., Romanova Yu.M., Sidorenko S.V., Skazhenik V.Yu., Skala L.Z., Trukhina G.M. *Общая и санитарная микробиология с техникой микробиологических исследований*. – СПб.: Лань, 2016. 588 с.]

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.

7. 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 17.05.2021
Принята к печати 16.06.2021

Received 17.05.2021
Accepted 16.06.2021