

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ПО ИЗУЧЕНИЮ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНОЙ СУБСТАНЦИИ ДЛЯ ВЕТЕРИНАРИИ

Н. А. ЗАБОКРИЦКИЙ, доктор медицинских наук, старший научный сотрудник, доцент,
Институт иммунологии и физиологии Уральского отделения Российской академии наук
(620049, г. Екатеринбург, ул. Первомайская, д. 106)

Д. Ю. САВИНЫХ, генеральный директор,
Научно-производственный центр “Уралбиосинтез”
(620024, г. Екатеринбург, ул. Новинская, д. 2, лит. Д)

Ключевые слова: биологически активная субстанция, антагонистическая и биохимическая активность, протективные и иммуностимулирующие свойства, перспективы создания нового препарата для ветеринарии.

Выполненные нами теоретические 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 предположить возможность разработки новой биологически активной субстанции как основы нового перспективного препарата для ветеринарии. 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 метаболической субстанции. 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 анти-токсическими, антиаллергическими, противорадиационными и другими эффектами. Разработан экспериментальный образец биологически активной субстанции на основе метаболитов специально выбранного пробиотического штамма *Bacillus subtilis* В-9906, характеризующегося высоким уровнем продукции таких биологически активных веществ, как белково-полисахаридный комплекс, свободные аминокислоты, пуриновые и пиримидиновые основания, витамины В₂ и В₆, протеолитические ферменты, антибиотикоподобные соединения. При экспериментальном моделировании острого генерализованного сальмонеллеза выявлено существенное увеличение выживаемости лабораторных животных, для лечения которых использовали экспериментальный образец. Изучены антагонистическая и биохимическая активность, протективные и иммуностимулирующие свойства разработанной метаболической субстанции.

EXPERIMENTAL STUDIES OF THE BIOLOGICALLY ACTIVE SUBSTANCE FOR VETERINARY USE

N. A. ZABOKRITSKIY, doctor of medical sciences, senior researcher, associate professor
Institute of Immunology and Physiology of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences
(106 Pervomayskaya Str., 620049, Ekaterinburg)

D. Y. Savinykh, general director,
Scientific industry center “Uralbiosintez”
(2, lit. D Novinskaya Str., 620024, Ekaterinburg)

Keywords: biologically active substance, biochemical and antagonistic activity, protective and immune stimulating properties, the prospect of creating a new drug for veterinary use.

The theoretical researches executed by us, and also long-term experience of conducting pilot studies of the pro-biotic microorganisms, and practical use of the medicines and drugs framed on their basis allowed us to assume a possibility of development of new biologically active substance as a base of new perspective drug for a veterinary medicine. For the solution of an objective it was necessary to conduct first of all researches on the choice of a pro-biotic microorganism, in pilot studies to study its biological properties and based on the received results to make the decision about the expediency of creation of an experimental sample of metabolic substance on its basis. The largest biological potential and a set of positive properties which can effectively be used for development of pro-biotic drugs belong to the non-pathogenic sporiferous microorganisms of the sort *Bacillus* and in particular various strains of a hay rod. It is established that they are characterized by the expressed opposing properties concerning many types of opportunistic and pathogenic microorganisms, ability to have immunomodulatory effect (generally due to stimulation of various links of cellular and humoral immunity), and also have antitoxic, anti-allergenic, anti-radiation and other effects. The experimental sample of biologically active substance is developed on the basis of metabolites of specially chosen pro-biotic strain of *Bacillus subtilis* of V-9906 which is characterized by the high level of production of such biologically active agents as albuminous polysaccharide complex, free amino acids, the purine and pyrimidine bases, В₂ and В₆ vitamins, proteolytic enzymes, antibiotic-like bonds. At experimental modeling of an acute generalized salmonellosis, the essential augmentation of survival of laboratory animals for whose treatment an experimental sample was used has been discovered. Opposing and biochemical activity, protective and immunotropic properties of the developed metabolic substance are studied.

Положительная рецензия предоставлена Л. П. Ларионовым, доктором медицинских наук, профессором кафедры фармакологии и клинической фармакологии Уральского государственного медицинского университета.

Настоящие экспериментальные исследования были посвящены проблеме разработки биологически активной метаболической субстанции и оценки возможности ее использования для создания нового фармакологического ветеринарного препарата.

Ряд исследований показал, что пробиотические бактерии вида *Bacillus subtilis* в сравнении с другими видами пробиотических бактерий характеризуются существенно более высокой антагонистической и биохимической активностью и продуцированием широкого набора биологически активных веществ. Для последующих экспериментальных исследований был рекомендован выделенный нами и в последующем депонированный установленным порядком во Всероссийской Коллекции Промышленных Микроорганизмов (ФГУП ГосНИИГенетика), штамм *Bacillus subtilis* В-9906 [1, 2, 4, 7, 8, 10, 11]. Для сравнительных экспериментальных исследований использовали также и другие штаммы *Bacillus subtilis*: В-2335, В-4759, В-2895, В-9909, В-9906, В-3679.

Цель и методика исследований. Цель наших исследований – разработка экспериментального образца биологически активной субстанции и оценка ее фармакологической активности и эффективности.

Согласно классификации микроорганизмов, приведенных в Санитарных правилах СП 1.2.731-99, исследуемый штамм *Bacillus subtilis* относится к сапрофитам, то есть микроорганизмам, непатогенным для человека и животных, работа с которыми не требует специальных мер биологической защиты. Паспортные характеристики указанного штамма были в целом типичны для вида *Bacillus subtilis*.

Штамм *Bacillus subtilis* В-9906 не является генетически модифицированным. Бактериальные клетки представляют собой аэробные грамположительные спорообразующие палочки размером 0,8–2,7 мкм, расположенные одиночно или в виде цепочек. В аэробных условиях образуют овальные споры, которые располагаются в клетках центрально. При спорообразовании раздувания клеток не наблюдается. Хорошо растет на питательных средах: мясо-пептонном агаре, сусло-агаре, среде Громыко, среде Гаузе 2.

Проявляет высокую антагонистическую активность в отношении тест-культур: *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *Shigella sonnei*, *Salmonella typhimurium*.

Выращивание пробиотических клеток *Bacillus subtilis* штамма В-9906 в объемах, необходимых для получения комплекса метаболитов, производили глубинным способом с использованием ферментера объемом 10 литров. Для культивирования использовали казеиновую среду с добавлением солей кальция хлорида, сульфатов магния и марганца, хлорида натрия и сульфата железа. Глюкозу и раствор кальция хлорида вносили непосредственно при посеве с со-

блюдением асептических условий. Выращивание проводили при температуре $(36 \pm 1)^\circ\text{C}$ в течение 36 ± 4 часов, что соответствовало окончанию стационарной фазы роста.

Комплекс биологически активных веществ получали в лабораторных условиях по имеющимся в настоящее время в научной литературе рекомендациям [2, 3, 5, 6, 9].

Культуральную жидкость подвергали следующим технологическим операциям:

- центрифугированию ($8000 \text{ об./мин}^{-1}$ 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;

- 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 биологически активных веществ, 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 использованием колонки Supelcosil™ LC-18 ($250 \times 4,6$ мм, размер частиц $\frac{3}{4} 5$ мкм).

Экспериментальный образец субстанции представлял собой порошок беловато-серого цвета, содержащий комплекс эндо- и экзометаболитов (протеины, аминокислоты, ферменты, антибиотические вещества и др.) и структурные компоненты разрушенных бактериальных клеток штамма В-9906.

Результаты экспериментальных исследований по изучению безопасности метаболической субстанции выполнены с использованием лабораторных животных (белые мыши, белые крысы) при различных путях введения (внутрижелудочном и внутрибрюшинном) показали отсутствие острого и хронического токсических воздействий. Согласно ГОСТ 12.1.007.76 субстанция относится к IV классу опасности «вещества безопасные».

Результаты исследований. Сравнительные экспериментальные исследования по изучению антагонистической активности, интенсивности синтеза такого важного компонента метаболической субстанции, как протеолитические ферменты, продуцируемые различными штаммами *Bacillus subtilis*,

Оценка антагонистической активности споровых культур штаммов *Bacillus subtilis* ($M \pm m, n = 3$)

The study of antagonistic activity of spore cultures of *Bacillus subtilis* ($M \pm m, n = 3$)

№ п/п № р/р	Образцы препаратов Samples of drugs	Зоны угнетения роста тест-культур, мм The zone of inhibition of growth of test cultures, mm						
		<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> ATCC 19615
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 over 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) Control (sterile paraffin oil)	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)».
Note: *accurate ($P < 0.05$) differences acc. to U-criterion Mann-Whitney compared to the group "Control (sterile paraffin oil)".

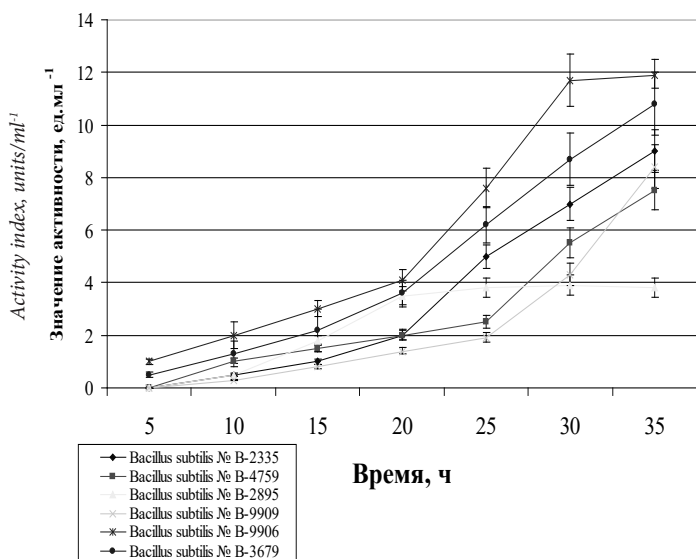


Рис. 1. Сравнительная оценка протеолитической активности различных пробиотических штаммов ($n = 3$).

Примечания: 1) Протеолитическую активность штаммов *Bacillus subtilis* оценивали при культивировании в жидкой питательной среде.

2) Различия достоверные ($P < 0,05$) по U-критерию Манна-Уитни во всех случаях в группе «*Bacillus subtilis* № B-9906» по отношению к группе «*Bacillus subtilis* № B-9909».

Fig. 1. Comparative evaluation of proteolytic activity of different probiotic strains ($n = 3$).

Notes: 1) The proteolytic activity of strains of *Bacillus subtilis* were evaluated when cultured in liquid nutrient medium.

2) Differences were statistically significant ($P < 0.05$) at the U-Mann-Whitney test in all cases in the group of "*Bacillus subtilis* B-9906" relative to group "*Bacillus subtilis* B-9909".

а также протективных свойств были выполнены с целью обоснования объективных критериев для выбора конкретного штамма, обладающего наиболее оптимальными характеристиками для последующего конструирования на его основе экспериментального образца биологически активной субстанции (табл. 1, 2, рис. 1).

Анализ полученных сравнительных экспериментальных данных свидетельствует о том, что выбранные для исследований бактериальные культуры обладают достаточно высоким уровнем специфической антагонистической активности и способны подавлять рост и размножение тест-штаммов различных групп патогенности. В целом, сравнительно более высокими показателями по интенсивности ингибирования роста тест-культур характеризовался штамм *Bacillus subtilis* B-9906.

Таким образом, оценка биохимической активности, результаты которой представлены на рис. 1, показала, что протеолитические ферменты при глубинном способе культивирования в наибольших концентрациях синтезируются такими штаммами, как *Bacillus subtilis* B-9906, *Bacillus subtilis* B-4759, *Bacillus subtilis* B-2335. Причем штамм *Bacillus subtilis* B-9906 обладал способностью продуцировать указанные ферменты не только в сравнительно более высоких концентрациях, но и на более ранние сроки культивирования.

Оценка влияния метаболитических субстанций пробиотических штаммов на выживаемость белых мышей (M ± m, n = 3)

Table 2

Assessment of the effect of metabolic substances of probiotic strains on the survival of white mice (M ± m, n = 3)

Метаболическая субстанция штаммов <i>Metabolic substance of strains</i>	Количество животных (общее/в группе), шт. <i>The number of animals (total/per group), pcs.</i>		Количество павших животных (общее/в группе), шт. <i>The number of dead animals (total/per group), pcs.</i>		Количество выживших животных (общее/в группе), шт. <i>The number of surviving animals (total/per group), pcs.</i>		Выживаемость, % <i>Survival, %</i>
Bacillus subtilis B-9906	60	20	14	4	46	16	76,6*
		20		5		15	
		20		5		15	
Bacillus subtilis B-4759	60	20	21	8	39	12	65,0*
		20		6		14	
		20		7		13	
Bacillus subtilis B-2335	60	20	28	9	32	11	53,3*
		20		10		10	
		20		9		11	
Контроль (без лечения) <i>Control (without treatment)</i>	60	20	38	14	22	6	36,6
		20		12		8	
		20		12		8	

Примечание: *Различия достоверны при P < 0,05.

Note: *The differences in the signs of the statistically significant at P < 0.05.

Таблица 3

Показатели гуморального иммунитета и уровня α-интерферона сыворотки крови белых мышей при моделировании острого сальмонеллеза на фоне применения метаболитической субстанции (M ± m, n = 10)

Table 3

Change of humoral immunity and level of α-interferon serum of white mice during experimental acute salmonellosis on the background of metabolic substances (M ± m, n = 10)

Группы животных <i>Groups of animals</i>	Срок наблюдения, сутки <i>Time observation, days</i>	Исследуемые показатели <i>The studied parameters</i>					
		Ig M, мг·см ⁻³ <i>mg·cm⁻³</i>	Ig A, мг·см ⁻³ <i>mg·cm⁻³</i>	Ig G, мг·см ⁻³ <i>mg·cm⁻³</i>	Ig E, МЕ·см ⁻³ <i>ME·cm⁻³</i>	α-ИФН, пг·см ⁻³ <i>α-interferon, pg·cm⁻³</i>	ЦИК, опт.ед. <i>Circulating immune complexes opt. units</i>
Метаболическая субстанция штамма B-9906 <i>Metabolic substance of strain B-9906</i>	1	9,15 ± 0,2*	0,77 ± 0,18	8,7 ± 1,6	0,22 ± 0,02	18,1 ± 1,2*	0,30 ± 0,02*
	3	6,74 ± 0,3*	1,46 ± 0,16*	14,1 ± 1,5	0,14 ± 0,03*	30,1 ± 1,4*	0,32 ± 0,03
	7	4,55 ± 0,31*	1,22 ± 0,16*	11,3 ± 1,5*	0,13 ± 0,03*	27,1 ± 1,3*	0,18 ± 0,03*
Контроль (без лечения) <i>Control (without treatment)</i>	1	9,64 ± 0,2	0,73 ± 0,15	8,6 ± 1,7	0,25 ± 0,02	10,1 ± 1,4	0,37 ± 0,02
	3	8,93 ± 0,2	1,62 ± 0,16	16,5 ± 1,4	0,18 ± 0,02	22,9 ± 1,5	0,31 ± 0,03
	7	6,46 ± 0,3	1,36 ± 0,16	14,8 ± 1,5	0,17 ± 0,03	21,8 ± 1,4	0,20 ± 0,03

Примечание: оценку различий средних значений определяли методом дисперсионного анализа (ANOVA). *достоверные (P < 0,05) различия по F-критерию Фишера по сравнению с группой «Контроль (без лечения)».

Note: the assessment of differences of mean values was determined by analysis of variance (ANOVA). *accurate (P < 0.05) differences according to F-Fisher criterion, compared to the group "Control and treatment".

Экспериментальную оценку протекторных свойств метаболитических субстанций, полученных на основе изучаемых штаммов *Bacillus subtilis*, проводили на лабораторных животных (белых мышах) при моделировании у них острого генерализованного сальмонеллеза, который вызвали внутрибрюшинным введением лабораторным животным суспензии *Sal. typhimurium* [6] (табл. 2).

Наблюдение за экспериментальными животными осуществляли на протяжении 7 суток, в течение которых белым мышам ежедневно интрагастрально вводили изучаемую метаболитическую субстанцию (0,005 г в 0,5 мл физиологического раствора).

Как видно из данных, представленных в табл 2, процент выживших животных был наиболее высоким при назначении субстанции штамма B-9906 и составлял 76,6 %.

Исследования гуморального статуса лабораторных животных с острым сальмонеллезом показало наличие выраженного иммуномодулирующего эффекта при назначении метаболической субстанции, о чем свидетельствовали результаты оценки динамики изменения таких показателей, как IgM, IgA, IgG, IgE, ЦИК. Имела место также стимуляция выработки эндогенного α -интерферона, а также более раннее переключение синтеза IgM на IgG. Механизм данного действия, по нашему мнению, может быть обусловлен специфическими иммуотропными свойствами субстанции и объясняется как прямым, так и опосредованным воздействием компонентов метаболического для решения конкретных задач практической ветеринарии.

Литература

1. Забокрицкий Н. А. Биологически активные вещества, синтезируемые пробиотическими микроорганизмами родов *Bacillus* и *Lactobacillus* // Здоровье и образование в XXI веке. 2015. Т. 17. № 3. С. 80–90.
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. Челябинск, 2014. 47 с.
3. Забокрицкий Н. А. Пробиотики как новый класс современных медицинских иммунобиологических препаратов // Здоровье и образование в XXI веке. 2015. Т. 17. № 5. С. 30–39.
4. Забокрицкий Н. А. Фармако-физиологические аспекты разработки современных биогелей в составе трансдермальных терапевтических систем и изучение их терапевтической эффективности в эксперименте // Здоровье и образование в XXI веке. 2014. Т. 16. № 4. С. 269–273.
5. Лабинская А. С. Микробиология с техникой микробиологических исследований. М. : Бином, 2012. 394 с.
6. Миронов А. М. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Ч. 1. М., 2013. 944 с.
7. Онищенко Г. Г., Кутырев В. В. Лабораторная диагностика опасных инфекционных болезней : практическое руководство. М., 2009. 472 с.
8. Holzapfel W. H., Schillinger U. Introduction to pre- and probiotics // Food Research International. 2002. № 35. P. 109–116.
9. Kailasapathy K. A., Chin J. Survival and therapeutic potential of probiotic organisms with reference to *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* spp. // Immunol. Cell. Biology. 2000. Vol. 78. P. 80–88.
10. Lee Y. K., Salminen S. Handbook of Probiotics and Prebiotics. New Jersey, 2009. 161 p.
11. Russel J., Cohn R. Probiotics. Edinburgh, 2012. P. 5–58.

References

1. Zabokritskiy N. A. Biologically active agents synthesized by probiotic microorganisms of the sorts *Bacillus* and *Lactobacillus* // Health and education in the 21st century. 2015. Vol. 17. № 3. P. 80–90.
2. Zabokritskiy N. A. Justification of the directions in development and experimental studying of new pharmacological drugs on the basis of probiotics and their biologically active products : abstract of dis. ... dr. of med. sci. Chelyabinsk, 2014. 47 p.
3. Zabokritskiy N. A. Probiotics as a new class of modern medical immunobiological supplies // Health and education in the 21st century. 2015. Vol. 17. № 5. P. 30–39.
4. Zabokritskiy N. A. Pharmaceutical and physiological aspects of development of modern biogels in the structure of transdermal therapeutic systems and study of their therapeutic effectiveness in an experiment // Health and education in the 21st century. 2014. Vol. 16. № 4. P. 269–273.
5. Labinskaya A. S. Microbiology with technique of microbiological researches. M. : Binom, 2012. 394 p.
6. Mironov A. M. Guide to carrying out preclinical trials of medicines. P. 1. M., 2013. 944 p.
7. Onishchenko G. G., Kuttyrev V. V. Laboratory diagnostics of dangerous infectious diseases : practical guidance. M., 2009. 472 p.
8. Holzapfel W. H., Schillinger U. Introduction to pre- and probiotics // Food Research International. 2002. № 35. P. 109–116.
9. Kailasapathy K. A., Chin J. Survival and therapeutic potential of probiotic organisms with reference to *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* spp. // Immunol. Cell. Biology. 2000. Vol. 78. P. 80–88.
10. Lee Y. K., Salminen S. Handbook of Probiotics and Prebiotics. New Jersey, 2009. 161 p.
11. Russel J., Cohn R. Probiotics. Edinburgh, 2012. P. 5–58.