

Молекулярно-биологические проблемы создания лекарственных средств и изучение механизма их действия

© Коллектив авторов, 2006

А. Н. Забокрицкий¹, Л. П. Ларионов², Е. Н. Плохушко¹,
П. Г. Васильев¹, Н. А. Забокрицкий²

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ НОВОГО БАКТЕРИЙНОГО ПРЕПАРАТА СУБТИЛАКТ ПРИ ЛЕЧЕНИИ ДИСБАКТЕРИОЗОВ

¹ Центр военно-технических проблем биологической защиты научно-исследовательского института Министерства Обороны;

² Уральская Государственная медицинская академия, Екатеринбург

Показано, что применение экспериментального образца нового бактериального препарата при экспериментальном дисбактериозе обеспечивает выздоровление подопытных животных и быструю нормализацию микробиоценоза кишечника. Совместное применение бактерий *B. Subtilis* 3 и *L. plantarum* 8P-A3 позволяет снизить терапевтическую дозу в 1000 раз по сравнению с известными пробиотиками на основе бацилл и лактобацилл. Установлено, что экспериментальный образец нового пробиотика оказывает стимулирующее влияние на показатели неспецифического иммунитета, что приводит к повышению защитных функций организма экспериментальных животных.

В последние годы в Российской Федерации наблюдается увеличение распространенности инфекционных заболеваний, в том числе кишечных инфекций и дисбактериозов [1 – 4].

В настоящее время в практике лечения и профилактики острых кишечных инфекций и дисбактериозов широкое применение находят медицинские бактериальные препараты: севакол, колифлорал, колибактерин, бифидумбактерин, бификол, ацилакт, лактобактерин, бактисубтил, биоспорин, флонивин и др., которые однако обладают недостаточной эффективностью при определенных формах дисбактериозов [4 – 7]. При применении пробиотиков на основе бацилл следует помнить, что культуры некоторых штаммов в больших дозах способны вызывать у людей инфекционные поражения, вопросы кинетики и длительной персистенции бацилл в организме человека изучены недостаточно.

Экспериментальная часть

В качестве основы для создания новых пробиотиков нами выделены бактерии рода *Lactobacillus* и вида *B. subtilis*, совмещение которых в одном препарате является эффективным прежде всего потому, что они могут воздействовать на различные звенья патогенетического процесса.

На первом этапе данной работы проводили исследования по изучению и выбору активных культур штаммов бацилл и лактобацилл из музейной коллекции и выделенных самостоятельно. Выбор активных культур штаммов осуществляли с учетом следующих критериев: определение их антагонистической активности по отношению к условно-патогенным и патогенным бактериям *in vitro*, изучение характера конку-

рентных взаимоотношений с другими штаммами, их иммуномодулирующей активности, цитоадгезирующих свойств, технологичности.

В результате выполненной работы были отобраны 2 штамма культур бактерий для включения в состав нового биопрепарата — *B. subtilis* 3 и *L. plantarum* 8P-A3.

Установлено, что в условиях смешанных микробных популяций изучаемая культура *L. plantarum* подавляет адгезивные свойства условно-патогенных микроорганизмов, а также увеличивает фагоцитарную активность нейтрофилов и перитонеальных макрофагов, общую бактерицидную и лизоцимную активность сыворотки крови.

Культура штамма *B. subtilis* 3, в свою очередь, проявляет высокую антагонистическую активность в отношении многих патогенных и условно-патогенных микроорганизмов из родов *Candida*, *Staphylococcus*, *Proteus*, *Campilobacter*, *Shigella*, *Salmonella*, но не оказывает антагонистического действия на представителей нормальной микрофлоры, что создает условия для бесконкурентного восстановления аутофлоры. Бациллы характеризуются способностью стимулировать пищеварительные процессы и оказывать антиаллергическое и антитоксическое действие.

При совместном выращивании культур штаммов *B. subtilis* 3 и *L. plantarum* 8P-A3 на плотных питательных средах было установлено, что эти штаммы не оказывают друг на друга антагонистического воздействия и могут служить компонентами для создания комплексного препарата. Важно также отметить, что эти штаммы сохраняют жизнеспособность и активность

Антагонистическая активность различных соотношений *B. subtilis* 3 и *L. plantarum* 8P-A3 в отношении тест-культур (через 24 ч выращивания)

Соотношение вариантов <i>B. subtilis</i> 3 и <i>L. plantarum</i> 8P-A3, % кл · см ⁻³	<i>S. sonnei</i>	<i>S. typhimurium</i>	<i>S. aureus</i>	<i>C. albicans</i>
90:10 (5,3 · 10 ⁶ кл · см ⁻³ /1,0 · 10 ⁶ кл · см ⁻³)	+ ¹	+	+	+
80:20 (4,6 · 10 ⁶ кл · см ⁻³ /2,0 · 10 ⁶ кл · см ⁻³)	+	+	+	+
70:30 (4,1 · 10 ⁶ кл · см ⁻³ /2,9 · 10 ⁶ кл · см ⁻³)	+	+	+	+
60:40 (3,6 · 10 ⁶ кл · см ⁻³ /4,6 · 10 ⁶ кл · см ⁻³)	— ²	—	—	—
50:50 (2,9 · 10 ⁶ кл · см ⁻³ /5,2 · 10 ⁶ кл · см ⁻³)	—	—	—	—
40:60 (2,1 · 10 ⁶ кл · см ⁻³ /6,0 · 10 ⁶ кл · см ⁻³)	—	—	—	—
30:70 (1,5 · 10 ⁶ кл · см ⁻³ /6,9 · 10 ⁶ кл · см ⁻³)	—	+	—	—
20:80 (1,2 · 10 ⁶ кл · см ⁻³ /8,3 · 10 ⁶ кл · см ⁻³)	+	+	+	+
10:90 (0,5 · 10 ⁶ кл · см ⁻³ /9,4 · 10 ⁶ кл · см ⁻³)	+	+	+	+

¹ + — наличие роста
² — — подавление роста

при лиофильном высушивании и в процессе длительного хранения (не менее двух лет).

Для оценки антибактериальной эффективности различных комбинаций изучаемых культур в качестве тест-культур использовали *S. sonnei* 659, *S. typhimurium* 11, *S. aureus* 209 и *C. albicans* 690. Готовили ассоциации нативных микробных культур в различных количественных соотношениях для *B. subtilis* 3 и *L. plantarum* 8P-A3 соответственно (об. %): 90:10, 80:20, 70:30, 60:40, 50:50, 40:60, 30:70, 20:80, 10:90. Кроме того, исследовали образцы вариантов, разведенные в 10, 10², 10³, 10⁴ раз.

При определении оптимальных комбинаций культур в препарате, кроме того, изучали их взаимное влияние на цитоадгезию в условиях смешанных популяций.

Результаты и их обсуждение

Результаты экспериментальных исследований свидетельствуют о том, что бактерии не проявляют цитоадгезивных свойств и не подавляют цитоадгезивных свойств культуры штамма *L. plantarum* 8P-A3.

Таблица 2

Показатели качества экспериментального образца пробиотика субтилакт

Наименование показателя	Серия		
	1	2	3
Количество жизнеспособных клеток, 10 ⁶ :			
<i>B. subtilis</i> 3	2,3 ± 0,2	3,4 ± 0,2	4,2 ± 0,3
<i>L. plantarum</i> 8P-A	5,2 ± 0,8	5,9 ± 0,4	5,2 ± 0,8
Загрязнение посторонней микрофлорой	Отсутствует		
Антибактериальная активность	Полное подавление роста тест-культур <i>Staphylococcus aureus</i> 209, <i>Salmonella typhimurium</i> 11, <i>Shigella sonnei</i> 659, <i>Candida albicans</i> 690, <i>Proteus mirabilis</i> 237, <i>Escherichia coli</i> 157, <i>Staphylococcus epidermidis</i> 14990, <i>Staphylococcus saprophyticus</i> , <i>Proteus vulgaris</i> 177		

Согласно данным, представленным в табл. 1, оптимальным соотношением бактериальных культур *B. subtilis* 3 и *L. plantarum* 8P-A3 для получения препарата является 1/2 при количестве живых микробных клеток не менее 2,1 · 10⁶ кл · см⁻³ для *B. subtilis* 3 и 4,6 · 10⁶ кл · см⁻³ для *L. plantarum* 8P-A3.

В дальнейшем определяли оптимальные условия глубинного культивирования выбранных штаммов, критерии оценки готовности нативных культур и порядок приготовления экспериментального образца препарата, а также проводили сравнительное изучение биологических свойств глубинных и поверхностных культур исследуемых штаммов.

Были апробированы пять полужидких питательных сред: капустная среда, среда на основе панкреатического гидролизата крови крупного рогатого скота, среда на основе молочной сыворотки и казеиново-дрожжевая среда. К питательным средам добавляли 0,1 % агар-агар или желатин. Выращивание проводили в статических условиях при температуре (37 ± 1)°С. Посевная доза *L. plantarum* 8P-A3 составляла не менее 1,2 · 10⁷ кл · см⁻³.

В ходе исследований наилучшие результаты получены при использовании казеиново-дрожжевой и капустной сред; при выращивании изучаемой культуры в средах на основе панкреатического гидролизата крови крупного рогатого скота и на основе молочной сыворотки концентрация клеток была низкой. Показано, что после 8, 12 и 24 ч выращивания культуры в капустной среде в статических условиях количество клеток соответственно составляет 1,2 · 10⁹, 2,1 · 10⁹ и 7,8 · 10⁹ кл · см⁻³, через 30 ч культивирования концентрация бактерий увеличивается до 10,2 · 10⁹ кл · см⁻³.

При выращивании культуры на казеиново-дрожжевой среде в интервале времени от 8 до 12 ч концентрация клеток лактобактерий достигает 1,12 · 10¹⁰ кл · см⁻³, значение рН при этом составляло 4,52. Дальнейшее выращивание оказалось нецелесообразным, так как происходит резкое снижение значений рН и концентрация клеток уменьшалась до 4,22 · 10¹⁰ кл · см⁻³.

Для глубинного выращивания культуры штамма *B. subtilis* 3 использовали жидкую питательную среду на основе 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. Культуру выращивали в колбах на установке для выращивания бактерий при температуре $37 \pm 1^\circ \text{C}$ и 220 об/мин. Посевная доза *B. subtilis* составляла не менее $2,3 \cdot 10^6$ клеток в см^{-3} . Установлено, что в интервале времени от 24 до 30 ч концентрация клеток достигает максимума (соответственно $1,94 \cdot 10^9 \cdot \text{см}^{-3}$ и $2,56 \cdot 10^9 \cdot \text{см}^{-3}$, значение pH при этом составляет 6,8 – 6,65).

После ферментации и определения количества клеток каждой культуры их смешивали в установленном ранее соотношении. В полученную взвесь добавляли сахарозо-желатиновую защитную среду в соотношении 1:1. Затем стабилизированную микробную суспензию высушивали на установке лиофильного высушивания. Состав готового препарата приведен ниже:

количество живых клеток *B. subtilis* 3 ($2,9 \pm 0,7$) $\times 10^6 \text{ см}^{-3}$;

количество живых клеток *L. plantarum* 8P-A3 ($5,2 \pm 0,8$) $\cdot 10^6 \text{ см}^{-3}$;

концентрация сахарозы ($0,020 \pm 0,002$) г;

концентрация желатина ($0,0060 \pm 0,0006$) г

Были приготовлены 3 лабораторные серии экспериментального образца препарата, которому дали рабочее наименование субтилакт. Для контроля качества экспериментального образца определяли количество жизнеспособных клеток, антагонистическую активность препарата методом отсроченного антагонизма и отсутствие посторонней микрофлоры.

Показатели качества полученных серий представлены в табл. 2.

Специфическую активность субтилакта определяли у белых мышей и кроликов при экспериментальном дисбактериозе, вызываемом путем введения в желудок ампиокса в дозе 4 мг в сутки белым мышам (массой

18 – 20 г) в течение 5 дней. Препаратами сравнения служили биоспорин (на основе штамма *B. subtilis* 3) и лактобактерин (на основе штамма *L. plantarum* 8P-A), которые вводили в течение 7 суток в дозе $2 \cdot 10^6$ клеток для белых мышей, $2,5 \cdot 10^8$ клеток — для кроликов. Субтилакт вводили в дозе $2 \cdot 10^3$ клеток для белых мышей, $2,5 \cdot 10^5$ клеток — для кроликов также в течение 7 суток.

Данные по изучению влияния изучаемых препаратов на микробиоценоз кишечника животных при экспериментальном дисбактериозе приведены в табл. 3. Для оценки состояния противомикробной защиты на 10 сутки с начала лечения у подопытных животных определяли общую бактерицидную активность сыворотки крови и количество лейкоцитов (табл. 4, рисунок).

Показано, что после приема ампиокса у лабораторных животных происходит снижение общего количества анаэробов (особенно лакто- и бифидобактерий), повышение общего количества аэробов, а также появление в большом количестве неполноценных в ферментативном отношении кишечных палочек; протей, плазмокоагулирующего стафилококка, дрожжевых грибов. Кроме того, повышалась концентрация гемолизирующей микрофлоры, лактозонегативных энтеробактерий.

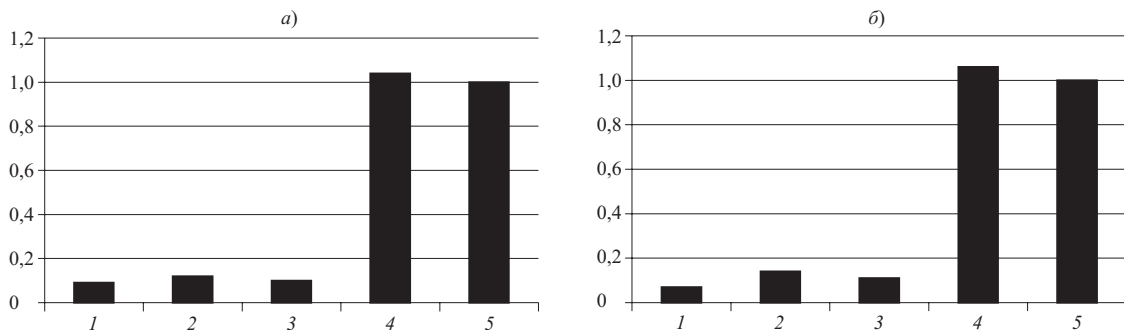
Дисбактериоз кишечника лабораторных животных сопровождается повышенным содержанием в крови лейкоцитов, в том числе относительного количества зрелых и незрелых нейтрофилов, моноцитов, а также снижением относительного количества лимфоцитов. Кроме того, отмечали снижение общей иммунологической резистентности организма, так как общая бактерицидная активность сыворотки крови (ОБАСК) у лабораторных животных с экспериментальным дисбактериозом была меньше, чем у интактных животных ($p < 0,01$).

Как видно из данных, приведенных в табл. 3, после применения субтилакта отмечается увеличение общего количества анаэробов, восстановление до показателей нормы количества бифидо- и лактобактерий и в то

Таблица 3
Влияние субтилакта на состав микрофлоры кишечника мышей и кроликов при экспериментальном дисбактериозе

Группа животных	Общее количество		Концентрация бактерий, lg КОЕ \cdot г $^{-1}$			
	аэробов lg КОЕ \cdot г $^{-1}$	анаэробов lg КОЕ \cdot г $^{-1}$	<i>Bifidobacterium</i>	<i>Lactobacterium</i>	Условно патогенных энтеробактерий	<i>Candida</i>
Дисбактериоз	$9,42 \pm 0,18$	$4,18 \pm 0,16$	$2,04 \pm 0,11$	$0,24 \pm 0,14$	$5,34 \pm 0,86$	$4,12 \pm 0,18$
	$9,85 \pm 0,16$	$3,24 \pm 0,26$	$1,04 \pm 0,26$	$0,14 \pm 0,11$	$6,14 \pm 0,66$	$4,07 \pm 0,11$
Дисбактериоз + лактобактерин	$8,12 \pm 0,14$	$8,42 \pm 0,16^*$	$7,12 \pm 0,14^*$	$6,92 \pm 0,18^*$	$4,86 \pm 0,43^*$	$4,86 \pm 0,27$
	$8,68 \pm 0,14$	$8,32 \pm 0,13^*$	$7,12 \pm 0,14$	$6,92 \pm 0,18^*$	$4,16 \pm 0,43^*$	$4,86 \pm 0,27$
Дисбактериоз + биоспорин	$8,28 \pm 0,18$	$8,08 \pm 0,14^*$	$6,42 \pm 0,12^*$	$5,64 \pm 0,24^*$	$2,14 \pm 0,28^*$	$1,84 \pm 0,31^*$
	$8,48 \pm 0,18$	$8,19 \pm 0,09^*$	$6,88 \pm 0,14$	$5,13 \pm 0,24^*$	$2,12 \pm 0,38^*$	$1,61 \pm 0,22^*$
Дисбактериоз + субтилакт	$8,24 \pm 0,13$	$9,18 \pm 0,18^*$	$10,24 \pm 0,11^*$	$8,64 \pm 0,12^*$	$1,94 \pm 0,22^*$	$1,20 \pm 0,15^*$
	$8,04 \pm 0,19$	$9,98 \pm 0,18^*$	$10,24 \pm 0,32^*$	$8,52 \pm 0,22^*$	$1,49 \pm 0,13^*$	$1,15 \pm 0,11^*$
Интактные животные (контроль)	$8,41 \pm 0,12$	$9,12 \pm 0,18$	$10,12 \pm 0,11$	$8,42 \pm 0,24$	$2,12 \pm 0,14$	$1,41 \pm 0,18$
	$8,11 \pm 0,23$	$9,62 \pm 0,11$	$10,85 \pm 0,13$	$8,16 \pm 0,11$	$2,45 \pm 0,16$	$1,34 \pm 0,08$

* $p < 0,01$ по сравнению с контролем (дисбактериозом), в числителе представлен состав микрофлоры белых мышей, в знаменателе — кроликов.



Влияние субтилакта на бактерицидную активность сыворотки белых мышей (а) и кроликов (б) при экспериментальном дисбактериозе. По оси абсцисс — ОБАСК: 1 — при экспериментальном дисбактериозе, 2 — при лечении биоспорином, 3 — при лечении лактобактерином, 4 — при лечении субтилактом, 5 — интактные животные. По оси ординат — уровень ОБАСК. Бактерицидную активность сыворотки крови определяли *in vitro* по уменьшению числа жизнеспособных бактерий после контакта их взвеси с сывороткой лабораторных животных; бактерицидность выражали отношением концентрации тест-культуры в опыте к концентрации в контроле

же время снижение количества условно патогенных энтеробактерий, дрожжеподобных грибов. Субтилакт способствует восстановлению не только микробиоценоза, но и нарушенных механизмов естественного иммунитета (рисунок). Важно отметить, что после лечения экспериментального дисбактериоза биоспорином и лактобактерином ОБАСК снижается.

Сравнение результатов действия трех указанных пробиотиков на подопытных животных с экспериментальным дисбактериозом дает основание предположить, что более высокая эффективность комплексного пробиотика субтилакта объясняется тем, что данный препарат получен на основе бактерий микроорганизмов, дополняющих и усиливающих терапевтическую эффективность, присущую каждому из них. Важно отметить, что совместное применение бактерий *L. plantarum* и *B. subtilis* позволяет снизить терапевтическую дозу в 1000 раз по сравнению с биоспорином и другими известными пробиотиками на основе бацилл и лактобацилл.

Отметим, что бактерии штамма *L. plantarum* 8P-A3, входящие в состав нового препарата, оказывают заме-

стительное действие на микрофлору слизистой кишечника, они обладают выраженной адгезивностью к поверхностным структурам эпителиальных клеток кишечника и обеспечивают формирование полноценной защитной биопленки слизистой кишечника. Механизм действия лактобактерий штамма *L. plantarum* 8P-A3 обусловлен также продукцией антибиотиков, бактериоцинов, лизоцима, активацией лактопероксидазы. Важно отметить, что под влиянием данных бактерий происходит стимулирование фагоцитарной активности макрофагов и, особенно, нейтрофилов, их перекисных систем, что приводит к повышению неспецифической резистентности организма.

Антимикробная активность *B. subtilis* 3 связана с высокой антагонистической активностью в отношении многих патогенных и условно-патогенных микроорганизмов. Бациллы штамма *B. subtilis* 3 продуцируют комплекс веществ полипептидной, аминогликозидной, полиеновой и другой природы, они обладают разносторонней ферментативной активностью, благодаря чему проявляется не только их антимикробное

Т а б л и ц а 4

Влияние субтилакта на состав лейкоцитарной формулы крови при экспериментальном дисбактериозе

Группа лабораторных животных	Лейкоцитарная формула крови					
	Лимфоциты, %	Нейтрофилы, %			Моноциты, %	Эозинофилы, %
		юные	палочкоядерные	сегментоядерные		
Дисбактериоз	70,1 ± 1,8 *	1,4 ± 0,1	7,0 ± 0,5 *	18,2 ± 0,9 *	3,1 ± 0,3	0,2 ± 0,1
	41,9 ± 1,8 *	0,2 ± 0,1	8,1 ± 0,5 *	40,2 ± 0,9 *	3,4 ± 0,3	3,2 ± 0,2
Дисбактериоз + субтилакт	85,1 ± 0,3 *	0,9 ± 0,1 *	1,1 ± 0,5 *	10,9 ± 1,1 *	1,7 ± 0,3 *	0,3 ± 0,1 *
	6,2 ± 0,2 *	0,6 ± 0,1	6,2 ± 0,5 *	28,9 ± 1,1 *	2,6 ± 0,3	0,8 ± 0,1
Дисбактериоз + лактобактерин	76,2 ± 2,9	1,1 ± 0,6	2,2 ± 0,8	16,8 ± 1,6	3,7 ± 0,9	0,2 ± 0,1
	50,0 ± 1,9	1,0 ± 0,6	7,5 ± 0,5	36,9 ± 2,1	3,5 ± 1,7	1,1 ± 0,3
Дисбактериоз + биоспорин	75,2 ± 0,5	1,8 ± 0,2	2,0 ± 0,2	17,2 ± 0,9	3,4 ± 0,2	1,2 ± 0,5
	55,2 ± 0,2	0,4 ± 0,2	3,6 ± 0,8	36,4 ± 0,8	2,2 ± 0,3	2,2 ± 0,5
Интактные животные (контроль)	80,4 ± 1,7	1,2 ± 0,1	1,6 ± 0,1	14,2 ± 0,4	2,4 ± 0,3	0,2 ± 0,1
	59,5 ± 1,2	0,4 ± 0,1	5,6 ± 0,1	30,3 ± 0,6	2,9 ± 0,2	1,3 ± 0,1

* $p < 0,01$ (по сравнению с контролем); в числителе представлена лейкоцитарная формула белых мышей, в знаменателе — кроликов.

действие, но и компенсаторное участие в процессах кишечного пищеварения.

Перечисленные биологические свойства бактерий штаммов *B. subtilis* 3 и *L. plantarum* 8P-A3 определяют механизм действия экспериментального образца нового пробиотика. Совместное применение данных бактерий обеспечивает одновременное воздействие препарата на различные факторы и звенья патогенетического процесса, в результате чего комплексная бактериотерапия является более эффективной.

Таким образом, полученные экспериментальные данные позволяют сделать обоснованный вывод о высокой эффективности разработанного нового пробиотика и предложить его для проведения дальнейших испытаний.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Эпидемиология и инфекционные болезни*, № 3, 63 – 64 (1998).
2. В. М. Коршунов, *Ж. микробиол.*, № 3, 48 – 55 (1995).
3. Н. В. Литусов, И. А. Поберий, Н. В. Садовой и др., *Перспективы использования эубиотика биоспорин в практике здравоохранения и военно-медицинской службы. Сб. материалов*, Екатеринбург (1997), сс. 6 – 10.
4. Ю. В. Лобзин, А. Л. Позняк, В. М. Добрынин, С. М. Захаренко, *Дисбактериозы при острых кишечных инфекциях. Учебное пособие*, СПб. (1997).
5. Т. И. Фролочкина, *Фармац. вестник*, № 23, 22 – 23 (2002).
6. Ю. Л. Шевченко, *Журн. микробиол.*, № 6, 3 – 6 (2000).
7. G. M. Tannock, *Microbiol. Sci.*, 5, 21 – 25 (1988).

Поступила 11.05.04

EXPERIMENTAL EVALUATION OF SUBTILACT: A NEW PREPARATION FOR THE TREATMENT OF DYSBACTERIOSIS

A. N. Zabokritskii¹, L. P. Larionov², E. N. Plokhushko¹, and N. A. Zabokritskii²

¹ Center for Military-Technical Problems of Biological Defense, Research Institute of Microbiology, Ministry of Defense of the Russian Federation, Yekaterinburg, Russia;

² The Ural State Medical Academy², Yekaterinburg, Russia

Experimental samples of the new microbiological preparation (probiotic) subtilact provide the survival of experimental animals with model dysbacteriosis and ensure fast normalization of the intestinal microbiocenosis. Combined administration of *B. subtilis* 3 and *L. plantarum* 8P-A3 makes it possible to decrease the therapeutic drug dose 1000 times as compared to the well known probiotics based on *bacilli* and *lactobacilli* species. The new probiotic preparation also produces stimulating effect upon nonspecific immunity parameters, which improves the defensive functions of the organism in experimental animals.