

УДК: 615.012.6::615.331/454.122

**БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ РАЗРАБОТКИ И КОНСТРУИРОВАНИЯ
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ОБРАЗЦОВ ПРОБИОТИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ
НА ОСНОВЕ ТРАНКУТАННЫХ ПРОВОДНИКОВ**© Н. А. Забокрицкий^{1,2}¹Уральский государственный медицинский университет
Россия, 620028 г. Екатеринбург, ул. Репина, 3.²Институт иммунологии и физиологии Уральского отделения РАН
Россия, 620219 г. Екатеринбург, ул. Первомайская, 106.
Тел.: +7 (343) 214 86 94.
pharmusma@rambler.ru

Статья посвящена актуальным биотехнологическим вопросам разработки, конструирования новых экспериментальных образцов пробиотических препаратов на основе инновационных транскутанных проводников – тизоля, эфтидерма и кремнийтитанорганического глицерогидрогеля. Для выполнения поставленной задачи был создан пробиотик, отвечающий заданным требованиям, изучены биологические свойства бактериальных культур, являющихся его основой, обоснована целесообразность использования гелевых транскутанных препаратов, проведены экспериментальные исследования по разработке оптимального компонентного состава гелевых пробиотических образцов. Применение предлагаемых препаратов в мягких лекарственных формах позволит существенно повысить эффективность их использования для лечения инфекционных, раневых и ожоговых поражений кожных покровов.

Ключевые слова: пробиотик, бациллат, тизоль, эфтидерм, кремнийтитанорганический глицерогидрогель, конструирование, доклиническая оценка.

Актуальность. В настоящее время в Российской Федерации наблюдаются существенные изменения в окружающей среде обитания. Нарастают неблагоприятные факторы (как экологические, так и социальные), ухудшаются условия жизни отдельных групп населения (особенно в регионах и сельской местности), качество атмосферного воздуха, продуктов питания, питьевой воды. Обеспеченность и доступность современными эффективными и безопасными лекарственными средствами достигли такого уровня, что это стало серьезно влиять на состояние здоровья населения страны, уровень заболеваемости и эпидемическую ситуацию по ряду инфекций [1, 2].

По данным различных источников существенно увеличилась не только общая инфекционная заболеваемость, но и количество инфекций, отличающихся вялотекущим, рецидивирующим и хроническим течением. Возросло и число инфекционных поражений, вызываемых условно-патогенными возбудителями [3–5]. Значительное внимание уделяется изучению различных видов таких микроорганизмов, их этиологической и патогенетической значимости в возникновении тех или иных патологических состояний [6].

В настоящее время все большую значимость приобретает проблема борьбы с воспалительными и гнойными заболеваниями кожных покровов и слизистых. По данным ряда авторов неудовлетворительные результаты лечения таких поражений существенно возросли [7–9].

Приведенные факты, с учетом потенциальной опасности постоянного их нарастания, охвата все большего количества, в первую очередь, трудоспо-

собного населения РФ, можно без преувеличения отнести к широко распространенным заболеваниям со всеми вытекающими отсюда последствиями.

В этой связи целесообразным представляется использование для лечения различных заболеваний пробиотических препаратов, которые в настоящее время считаются наиболее адекватными и эффективными профилактическими и лекарственными средствами [10–11].

Пробиотики являются продуктами естественного микробного синтеза, они абсолютно безвредны для людей, животных и растений, способны оказывать в кратчайшие сроки положительное влияние на различные физиологические, биохимические, иммунологические и другие функции организма человека. Показания к их применению все больше расширяются и кроме инфекционных болезней затрагивают такие сферы медицинской деятельности, как терапия, хирургия, стоматология, гинекология, дерматология. Они могут назначаться как взрослым, так и детям от одного года и старше [12].

В настоящее время многие из пробиотиков (42 наименования) являются представителями медицинских иммунобиологических препаратов (МИБП) и включены в официальные перечни, разрешающие их применение на территории Российской Федерации [13].

Существенное значение имеет и такой немаловажный в настоящее время факт, как себестоимость для производителя и цена продажи пробиотических препаратов, которая при их массовом производстве с использованием современного оборудования и другого биотехнологического оборудо-

вания реально может быть как минимум на порядок ниже, чем традиционных фармакологических средств [14, 15].

Таким образом, проведение исследований, направленных на создание новых видов эффективных медицинских пробиотических препаратов для лечения некоторых широко распространенных заболеваний, является актуальной проблемой современной фармакологической науки и позволит обеспечить российский фармацевтический рынок эффективными, доступными и сравнительно недорогими лекарственными средствами.

Цель работы – разработать и сконструировать экспериментальные образцы пробиотического препарата бацилакт с использованием современных трансдермальных проводников, оценить их антагонистическую активность в отношении некоторых патогенных и условно-патогенных микроорганизмов, значимых при инфекционных поражениях кожных покровов, провести доклинические испытания полученных образцов.

Материалы и методы исследований. Работа выполнена на кафедре фармакологии и клинической фармакологии ГБОУ ВПО «Уральская государственная медицинская академия» Минздрава России, а также в Институте иммунологии и физиологии УрО РАН, (г. Екатеринбург).

Использовали бактериальные культуры следующих пробиотических штаммов: *Bacillus subtilis* B-2335 и *Lactobacillus plantarum* 8P-A3.

Штамм *Bacillus subtilis* B-2335 депонирован и находится на постоянном хранении во Всероссийской Коллекции Промышленных Микроорганизмов (ФГУП ГосНИИ Генетика), штамм *Lactobacillus plantarum* 8P-A3 хранится в музейной коллекции ФГБУ «Пермский НИИ вакцин и сывороток».

Для выращивания штаммов *Bacillus subtilis* и *Lactobacillus plantarum* использовали плотную (агаризованную) питательную среду Гаузе 2, мясо-пептонный агар (МПА), мясо-пептонный бульон (МПБ) и капустный агар.

Поддержание штаммов бактерий в жизнеспособном и физиологически активном состоянии, изучение их морфологических, тинкториальных, культуральных свойств проводили в соответствии с существующими рекомендациями и требованиями.

Антагонистическую активность определяли в отношении тест-культур, полученных из музея ФГБУ ГИСК им. Л.А. Тарасевича. Для проведения исследований использовали штаммы тест-культур: *Staphylococcus aureus* 209P, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 14990, *Candida albicans* IMB 690, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9024, *Salmonella typhimurium* 55, *Escherichia coli* 0157, *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615, *Proteus vulgaris* 177.

Объектами исследований являлись экспериментальные образцы бактериального пробиотика бацилакт.

Конструирование, приготовление, изучение свойств, условий хранения и создаваемых на их основе экспериментальных образцов пробиотических препаратов осуществляли в соответствии с действующими требованиями и рекомендациями, изложенными в литературе, посвященной вопросам биотехнологии.

Биокомпоненты (биомассу) для приготовления различных видов экспериментальных образцов пробиотических препаратов получали путем культивирования на плотных и в жидких питательных средах, а также при глубинном культивировании.

Экспериментальные образцы пробиотика бацилакт содержали в своем составе культуры бактериальных клеток *Bacillus subtilis* B-2335 – $1 \cdot 10^6$ см⁻³ КОЕ и *Lactobacillus plantarum* 8P-A3 – $1 \cdot 10^6$ см⁻³ КОЕ и гелевые основы – тизоль, эфтидерм, кремнийтитанорганический глицерогидрогель (КТГГ).

Статистическую обработку осуществляли с помощью пакетов компьютерных программ Microsoft Office Excel 2007 и «Statistica 6.0» методами дисперсионного анализа (ANOVA). Оценку нормальности распределения полученных данных проводили по методу Колмогорова-Смирнова. Для достоверности межгрупповых различий использован U-критерий Манна-Уитни и F-критерий Фишера. Различия считали достоверными при $p < 0.05$.

Результаты исследований и их обсуждение

Для выполнения поставленной цели необходимо было выбрать пробиотические штаммы, отвечающие заданным требованиям, изучить биологические свойства полученных на их основе бактериальных культур, обосновать целесообразность использования гелевых транскутаных проводников, провести экспериментальные исследования по разработке оптимального компонентного состава гелевых пробиотических препаратов, провести их доклинические испытания.

Для конструирования препарата бацилакт были теоретически обоснованы и выбраны два вида пробиотических микроорганизмов: *Bacillus subtilis* B-2335 и *Lactobacillus plantarum* 8P-A3, а также три вида транскутаных проводников: эфтидерм, тизоль и кремнийтитанорганический глицерогидрогель.

Для выбора и оценки эффективности различных комбинаций изучаемых культур в экспериментальном образце препарата в качестве основного критерия использовали величину антагонистической активности (табл. 1).

Анализ результатов экспериментальных исследований показывает, что минимальная концентрация бактериальных клеток в смешанной культуре, при которой еще наблюдается полное подавление роста тест-культур, равна для *B. subtilis* B-2335 $2.3 \cdot 10^6$ кл·см⁻³, а для культуры *L. plantarum* 8P-A3 $5.4 \cdot 10^6$ кл·см⁻³.

Таблица 1

Антагонистическая активность различных соотношений и концентраций смешанных бактериальных культур штаммов *B. subtilis* B-2335 и *L. plantarum* 8P-A3

Соотношение (концентрации) бактериальных культур <i>B. subtilis</i> B-2335 и <i>L. plantarum</i> 8P-A3	Наличие роста тест-культур ($M \pm m$), $n=30$			
	<i>S. pyogenes</i> ATCC 19615	<i>S. typhimurium</i> 55	<i>S. aureus</i> 209P	<i>C. albicans</i> ИМБ 690
90:10	Наличие роста	Наличие роста	Наличие роста	Наличие роста
$5.5 \cdot 10^6 / 1.2 \cdot 10^6$	Наличие роста	Наличие роста	Наличие роста	Наличие роста
80:20	Наличие роста	Наличие роста	Наличие роста	Наличие роста
$4.8 \cdot 10^6 / 2.2 \cdot 10^6$	Наличие роста	Наличие роста	Наличие роста	Наличие роста
70:30	Наличие роста	Наличие роста	Наличие роста	Наличие роста
$4.3 \cdot 10^6 / 3.1 \cdot 10^6$	Наличие роста	Наличие роста	Наличие роста	Наличие роста
60:40	Нет роста	Нет роста	Наличие роста	Нет роста
$3.8 \cdot 10^6 / 4.8 \cdot 10^6$	Нет роста	Нет роста	Нет роста	Нет роста
50:50	Нет роста	Нет роста	Нет роста	Нет роста
$3.1 \cdot 10^6 / 5.4 \cdot 10^6$	Нет роста	Нет роста	Нет роста	Нет роста
40:60	Нет роста	Нет роста	Нет роста	Нет роста
$2.3 \cdot 10^6 / 6.2 \cdot 10^6$	Нет роста	Наличие роста	Нет роста	Нет роста
30:70	Наличие роста	Наличие роста	Наличие роста	Наличие роста
$1.7 \cdot 10^6 / 7.1 \cdot 10^6$	Наличие роста	Наличие роста	Наличие роста	Наличие роста
20:80	Наличие роста	Наличие роста	Наличие роста	Наличие роста
$1.4 \cdot 10^6 / 8.5 \cdot 10^6$	Наличие роста	Наличие роста	Наличие роста	Наличие роста
10:90	Наличие роста	Наличие роста	Наличие роста	Наличие роста
$0.7 \cdot 10^6 / 9.6 \cdot 10^6$	Наличие роста	Наличие роста	Наличие роста	Наличие роста

Таблица 2

Оценка антагонистической активности гелевых форм пробиотика бацилакт на рост тест-культур^a

Экспериментальный образец	Суммарная концентрация пробиотических клеток, 10^6 КОЕ см^{-3}	Тест-культура. Величина зон подавления роста, мм ($M \pm m$, $n=30$)						
		<i>S. aureus</i> 209P	<i>S. epidermidis</i> ATCC 14990	<i>S. pyogenes</i> ATCC 19615	<i>C. albicans</i> ИМБ 690	<i>Ps. aeruginosa</i> ATCC 9024	<i>P. vulgaris</i> 177	<i>S. typhimurium</i> 55
Бацилакт и тизоль	1	28.2±2.3	20.1±1.9	21.8±2.0	>30	16.7±1.3	27.6 ±2.8	23.4±2.2
	2	29.4±2.8	20.5±1.8	25.3±2.2	>30	17.5±1.4	28.3 ±3.2	23.9±2.1
	3	>30	20.9±2.0	25.1±1.9	>30	18.0±1.8	>30	25.1±2.4
	5	>30	22.2±2.3	26.2±2.6	>30	19.0±2.1	>30	27.2±3.1
	10	>30	25.1±2.4	27.3±2.8	>30	20.6±1.8	>30	28.9±3.3
Бацилакт и эфтидерм	1	27.4±3.1	19.8±1.7	22.2±1.7	>30	15.6±1.6	26.4±2.8	23.2±2.0
	2	28.6±2.9	21.9±1.9	22.0±1.9	>30	17.4±1.9	27.2±2.6	23.9±1.9
	3	>30	21.4±2.0	24.6±2.0	>30	19.2±2.0	>30	24.7±2.1
	5	>30	22.3±2.1	25.9±2.3	>30	20.8±2.2	>30	27.0±2.3
	10	>30	24.8±2.2	26.5±2.4	>30	21.3±2.4	>30	28.8±2.9
Бацилакт и КТГГ	1	29.4±2.5	22.7±2.0	24.9±1.8	>30	18.2±1.9	29.4 ±2.7	23.9±2.1
	2	29.9±3.0	23.4±2.5	26.2±2.3	>30	19.3±2.0	>30	25.1±2.4
	3	>30	23.9±2.3	26.9±2.8	>30	20.4±1.8	>30	27.7±2.5
	5	>30	25.1±2.4	28.6±2.5	>30	22.1±2.1	>30	28.6±2.9
	10	>30	27.6±2.5	29.0±2.9	>30	23.8±2.6	>30	29.5±2.9
Био-компонент	1	29.1±2.2	23.2±1.8	26.2±1.7	>30	17.4±1.5	>30	22.6±2.1
	2	>30	23.6±2.3	27.0±2.1	>30	17.1±1.6	>30	23.3±2.5
	3	>30	26.4±2.2	27.6±2.6	>30	17.7±1.9	>30	23.8±2.7
	5	>30	26.8±2.5	27.9±2.7	>30	18.4±1.9	>30	26.7±2.6
	10	>30	26.9±2.4	29.3±2.8	>30	20.2±1.8	>30	28.5±2.9

^aВ качестве контроля использовали стерильное вазелиновое масло. Во всех случаях подавление роста тест-культур отсутствовало.

Препараты готовили путем тщательного перемешивания взятых исходных компонентов. Соотношение компонентов во всех трех экспериментальных образцах гелевых пробиотиков составляло 1:1. Для улучшения выживаемости бактериальных клеток и, в первую очередь, лактобацилл в готовый препарат добавляли глицерин (5 об. %).

Сохраняемость испытуемых препаратов изучали на различные сроки. Было установлено, что хранение в течение 3, 6 и 12 месяцев при температуре 4 ± 2 °C не оказывало существенного отрицательного влияния на жизнеспособность бацилл.

Изучение антагонистической активности исследуемых образцов биогелей (табл. 2) свидетель-

ствовало о их высокой антагонистической активности в отношении таких видов патогенных и условно-патогенных возбудителей, как: *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus epidermidis*, *Streptococcus pyogenes*, *Candida albicans*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus vulgaris* и *Salmonella typhimutium*. Сравнительно более значимые результаты были получены для экспериментального образца бацилакта на основе КТГГ.

Доклинические испытания экспериментальных образцов препарата бацилакт позволили установить отсутствие у них токсического действия как в условиях острой, так и хронической токсичности. Все образцы препаратов были безвредными и не вызывали никаких признаков патологического воздействия на лабораторных животных, что было также подтверждено результатами гематологических, биохимических, иммунологических и патоморфологических (гистологических) исследований.

Заключение

Таким образом, в результате проведенных доклинических исследований разработаны и испытаны новые перспективные мягкие лекарственные формы на основе культур *Bacillus subtilis* и *Lactobacillus plantarum* и трех видов транскутанных проводников (тизоля, эфтидерма и кремнийтитан-органического гидрогеля), рекомендуемые для лечения инфекционных и травматических повреждений кожных покровов.

Показана значимая антагонистическая активность предлагаемых экспериментальных образцов в отношении таких патогенных микроорганизмов, как: золотистый стафилококк, пиогенный стрептококк, синегнойная палочка, протей, сальмонелла, грибы рода *Candida*. Выполненные доклинические исследования свидетельствуют о безопасности разработанных образцов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Гарбузов Г. А. Дисбактериоз: лечение и профилактика без лекарств. СПб.: Питер, 2012. 224 с.
2. Melstrom K. A. J., Smith J. W., Gamelli R. L., Shankar R. New perspectives for a new century : implications of pathogen responses for the future of antimicrobial therapy // *J. Bum. Care. Res.* 2006. V. 27. №3. P. 251–264.
3. Голубкова А. А. Причины, условия и сигнальные признаки вспышек внутрибольничных инфекций в учреждениях родо-вспоможения // *Стерилизация и госпитальные инфекции.* 2006. №2. С. 23–28.
4. Онищенко Г. Г. Санитарно-эпидемиологическая обстановка // Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека. 2013. URL: http://rospotrebnadzor.ru/epidemiologic_situation/6114/html.
5. Rodriguez-Bano J., Navarro M. D., Romero L. et al. Clinical and Molecular Epidemiology of Extended-Spectrum β -Lactamase-Producing *Escherichia coli* as a Cause of Nosocomial infection or Colonization : Implications for Control // *Clin. Infect. Dis.* 2006. V. 42. P. 37–45.
6. Звездина Н. Д., Мальченко Л. А., Фатеева В. И., Бродский В. Я. Сигнальные факторы самоорганизации ритма синтеза белка в культурах гепатоцитов – ганглиозиды и катехоламины – функционируют независимо друг от друга // *Онтогенез.* М., 2008. Т. 39. №3. С. 198–207.
7. Козлов Р. С., Сивая О. В., Шпынев К. В. Антибиотикорезистентность *Streptococcus pneumoniae* в России в 1999–2005 гг. Результаты многоцентровых проспективных исследований PeI⁺AC-I и PeI⁺AC-II // *Клиническая микробиология и анти-микробная химиотерапия.* 2006. Т. 8. №1. С. 33–47.
8. Phaff S. J., Tiddens W. M., Verbrugh H. A., Ott A. Macrolide resistance of *Staphylococcus aureus* and *Haemophilus* species associated with long-term azithromycin use in cystic fibrosis Macrolide resistance of *Staphylococcus aureus* and *Haemophilus* species associated with long-term azithromycin use in cystic fibrosis // *J. Antimicrob. Chemother.* 2006. V. 57. P. 741–746.
9. Piddock L. J. Clinically relevant chromosomally encoded multidrug resistance efflux pumps in bacteria // *Clin. Microbiol. Rev.* 2006. V. 19. №2. P. 382–402.
10. Волков М. Ю. Комбинированный пробиотический препарат «Бактистатин» и его эффективность при желудочно-кишечных болезнях сельскохозяйственных животных : дис. ... д-ра биол. наук. М., 2006. 418 с.
11. Осипова И. Г. Экспериментально-клиническое изучение споровых пробиотиков : дис. ... д-ра биол. наук. М., 2006. 283 с.
12. Забокрицкий Н. А. Новый биогепапротектор для лечения социально-значимых заболеваний печени // *Сб. науч. статей и тез. XIII международного конгресса «Здоровье и образование в XXI веке».* М., 2012. Т. 14. №2. С. 49–50.
13. Патент на изобретение RU 2429869 «Средство «Гепатобиол», обладающее гепатопротективным действием» / Забокрицкий Н. А., Ладыгин О. В., Забокрицкий А. Н., Морозов М. П., Уракова Н. А., Ураков А. Л. Российская Федерация. Заявл. 2008125589/15 от 23.06.2008 г. Оpubл. 27.09.2011 г. Бюл. №27. 14 с.
14. Патент на изобретение RU 2452478 «Многофункциональный раствор для эпидуральных инстилляций» / Бондаренко Л. В., Ураков А. Л., Новиков В. Е., Забокрицкий Н. А., Виноградов А. В., Кашковский М. Л., Витер В. И., Вавилов А. Ю., Гайсина Л. Ф., Ливане Р. Л., Кривопалов С. А. Российская Федерация. Заявл. 2011106504/15 от 21.02.2011 г. Оpubл. 10.06.2012 г. Бюл. №16. 8 с.
15. Ураков А. Л., Уракова Н. А., Козлова Т. С. Локальная токсичность лекарств как показатель их вероятной агрессивности при местном применении // *Вестник Уральской медицинской академической науки* 2011. Т. 1. №33. С. 105–108.

Поступила в редакцию 03.08.2013 г.