

М.П.Неустроев<sup>1</sup>, А.Н.Мурашев<sup>2</sup>, Д.А.Бондаренко<sup>2</sup>, А.М.Степанова<sup>1</sup>, Н.П.Тарабукина<sup>1</sup>

## ИССЛЕДОВАНИЕ ТОКСИЧНОСТИ ПРЕПАРАТА САХАБАКТИСУБТИЛ НА КРЫСАХ

<sup>1</sup>Якутский НИИ сельского хозяйства, Якутск; <sup>2</sup>Филиал института биоорганической химии им. М.М.Шемякина и Ю.А.Овчинникова, Пушино

**Цель.** Определить безопасность и потенциальные токсические эффекты препарата Сахабактисубтил при его многократном внутрижелудочном введении крысам CD. **Материалы и методы.** Самцам и самкам крыс CD (Sprague-Dawley) разных экспериментальных групп внутрижелудочно однократно (группе 3 двукратно по 8 мл за введение с промежутком в 6 часов) на протяжении 14 дней ежедневно вводили различные дозы препарата или физраствор — контрольным животным. В течение 14 дней введения препарата и 14 дней отмены введения у всех животных определяли: массу тела, потребление корма, клинические признаки нарушения здоровья. На 15 и 29 дни исследования животные были подвергнуты эвтаназии и некропии с забором органов для последующего гистологического анализа. При некропии регистрировали массу внутренних органов, забирали образцы крови для изучения гематологических и биохимических показателей. **Результаты.** В ходе исследования гибели животных и признаков токсичности от введения тестируемого препарата на всем протяжении исследования не выявлено. Статистически значимых различий между группами по приросту массы тела, гематологическими и биохимическими показателями выявлено не было. **Заключение.** Препарат Сахабактисубтил является безопасным при многократном внутрижелудочном введении крысам CD.

Журн. микробиол., 2017, № 5, С. 59—64

Ключевые слова: пробиотик, Сахабактисубтил, крысы Sprague-Dawley (CD), токсичность, доклинические испытания

М.П.Неустроев<sup>1</sup>, А.Н.Мурашев<sup>2</sup>, Д.А.Бондаренко<sup>2</sup>, А.М.Степанова<sup>1</sup>, Н.П.Тарабукина<sup>1</sup>

## STUDY OF TOXICITY OF SAKHABACTISUBTIL IN RATS

<sup>1</sup>Research Institute of Agriculture, Yakutsk ; <sup>2</sup>Branch of Shemyakin and Ovchinnikov Research Institute of Bioorganic Chemistry, Puschino, Russia

**Aim.** Determine safety and potential toxic effects of Sakhabactisubtil during its multifold intra-gastric administration to CD rats. **Materials and methods.** Male and female CD rats (Sprague-Dawley) of various experimental groups received various doses of the preparation or saline (control group) once per day (twice for group 3 in 8 ml at 6 hours interval) intra-gastrically for 14 days. Body mass, forage use, clinical signs were determined for 14 days of the preparation administration and 14 days after cancellation in all the animals. The animals were euthanized and necropsy was carried out at days 15 and 29 of the study with extraction of organs for subsequent histological analysis. Mass of internal organs was registered during necropsy, blood samples were taken for study of hematologic and biochemical parameter evaluation. **Results.** Animal death and signs of toxicity were not detected during the study from administration of the tested preparation for the entire period. Statistically significant differences between groups by body mass growth, hematologic and biochemical parameters were not detected. **Conclusion.** Sakhabactisubtil is safe during multifold intra-gastric administration to CD rats.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2017, No. 5, P. 59—64

Key words: probiotic, Sakhabactisubtil, Sprague-Dawley rats, toxicity, preclinical studies

## ВВЕДЕНИЕ

Во всем мире наблюдается интерес к пробиотикам, которые входят в состав продуктов функционального питания, а также используются в качестве про-

филактических и лечебных препаратов. Препараты на основе спорообразующих аэробных бактерий, обладающие устойчивостью, высокой антагонистической, иммуномодулирующей и ферментативной активностью, способностью к адгезии на слизистой оболочке кишечника, испытываются и используются в животноводстве, ветеринарной [1, 6, 9 — 11, 13] и медицинской [2, 3, 7, 8, 12, 15] практике.

В настоящее время Якутским НИИ сельского хозяйства разработано и утверждено в Россельхознадзоре МСХ РФ лекарственное средство — пробиотик Сахабактисубтил. Препарат обладает антагонистическим активностью в отношении патогенных и условно патогенных микроорганизмов (бактерии, вирусы и грибы), способностью стимулировать полезную микрофлору и иммунобиологическую реактивность, индуцировать синтез интерферона, продуцировать ряд ферментов. По результатам НИР получены 34 патента РФ на изобретение [4, 5, 14].

Нами установлено отсутствие токсичности препарата Сахабактисубтил при однократном внутрижелудочном применении у мышей CD-1, что позволяет проводить дальнейшие доклинические испытания [4].

Исходя из вышеизложенного цель работы — исследовать токсичность препарата Сахабактисубтил при многократном внутрижелудочном введении крысам CD. Данное исследование входит в комплекс доклинических исследований, необходимых для обоснования клинических испытаний медицинских лекарственных средств.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Препарат Сахабактисубтил изготовлен из штаммов бактерий *B. subtilis* ТНП-3 и *B. subtilis* ТНП-5, депонированных во Всероссийском государственном научно-контрольном институте ветеринарных препаратов (Москва). Препарат состоит из равных соотношений суспензий культур штаммов, концентрация  $5 \times 10^9$  КОЕ/мл.

Исследования выполнялись в соответствии с нормативными актами Российской Федерации, регламентирующими сферу доклинических исследований: ГОСТ Р 53434-2009 «Принцип надлежащей лабораторной практики (GLP)» и Приказом Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации от 23 августа 2010 года № 708н, а также в соответствии с международными руководствами «OECD ENV/MC/CHMP(98)17, 1997 и ICH guideline S6 (R1) — preclinical safety evaluation of biotechnology-derived pharmaceuticals, EMA/CHMP/731268/1998 committee for medicinal products for human use (CHMP), June 2011.

Работа проведена в лаборатории биологических испытаний Филиала института биоорганической химии им. М.М.Шемякина и Ю.А.Овчинникова (Пушино).

Лабораторные животные (самцы и самки) линии Sprague-Dawley получены из НПП «Питомник лабораторных животных ФИБХ РАН» в возрасте 6 недель, живая масса 444,4±10,7 г. (самцы) и 223,9±4,8 г. (самки).

Количество самок 30, самцов 30 голов, группы по 20 животных (10 самок, 10 самцов). Самцам и самкам крыс CD разных экспериментальных групп внутрижелудочно однократно (группе 3 двукратно по 8 мл за введение промежутком в 6 часов) на протяжении 14 дней ежедневно вводили различные дозы препарата или физраствор — контрольным животным. В течение 14 дней введения препарата и 14 дней отмены введения у всех животных определяли: массу тела, потребление корма, клинические признаки нарушения здоровья.

## Схема проведения опыта

Номер группы	Группы	Количество животных				Доза (КОЕ <i>B.subtilis</i> /животное)	Объем, введения, мл
		Эвтаназия на 15 день		Эвтаназия на 29 день			
		М	Ф	М	Ф		
1	Контроль	5	5	5	5	0	4
2	Сахабактисубтил (доза 1)	5	5	5	5	20x10 <sup>9</sup>	4
3	Сахабактисубтил (доза 2)	5	5	5	5	80x10 <sup>9</sup>	16

Примечание. М — самцы, Ф — самки.

На 15 и 29 дни исследования животные были подвергнуты эвтаназии и некропсии с забором органов для последующего гистологического анализа. (табл.).

Измерения гематологических показателей проводили на автоматическом гематологическом анализаторе Mythic 18 VET (Woodley veterinary diagnostics, Швейцария).

В сыворотке крови определяли биохимические показатели: аланинаминотрансферазу, аспаратаминотрансферазу, щелочную фосфатазу, креатинин, общий белок, кальций, хлориды, фосфаты, глюкозу, альбумин, мочевины, общий билирубин, холестерин, триглицериды, глобулин. Измерения проводили на биохимическом анализаторе Сапфир-400 (Токуо Воeki LTD).

В конце исследования всех животных подвергали эвтаназии с помещением в СО<sub>2</sub> камеру с последующим обескровливанием.

Данные веса тела и потребления корма были проанализированы двухфакторным дисперсионным анализом ANOVA с последующим тестом Newman-Keuls или Duncan. Данные гематологии, биохимии и веса органов были проанализированы с использованием однофакторного дисперсионного анализа ANOVA с последующим тестом Newman-Keuls или непараметрического критерия Kruskal-Wallis с тестом Dunn в зависимости от типа распределения количественных данных. Статистический анализ проводили с программой Statistica ver. 7.1. Различия определяли при P<0,05.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В ходе исследование гибели животных зафиксировано не было. Признаков интоксикации организма, связанных с токсическим действием препарата, на всем протяжении исследования не выявлено.

Статистически значимых различий между животными, получившими тестируемый препарат, и контрольными животными по показателям массы тела и прироста массы тела ни у самцов, ни у самок выявлено не было.

У самцов крыс CD, получивших внутрижелудочно Сахабактисубтил в дозах 20x10<sup>9</sup> и 80x10<sup>9</sup> КОЕ *B.subtilis*/животное в течение 14 дней, не выявлено достоверных отличий в значениях гематологических показателей относительно контрольной группы сразу после отмены введения.

Спустя две недели после отмены введения в группе Сахабактисубтил — доза 2 (80x10<sup>9</sup> КОЕ *B.subtilis*/животное) отмечалось небольшое снижение среднего объема эритроцита (55,6±1,2 фл) относительно контрольного уровня (58,0±1,0 фл). В группе самцов Сахабактисубтил — доза 1 (20x10<sup>9</sup> КОЕ *B.subtilis*/животное) отмечалось снижение доли сегментоядерных нейтрофилов (3,2±0,8%) с тенденцией к снижению их абсолютного количества (0,51±0,23 Г/л) относительно контрольного уровня (6,2±1,3%, 0,80±0,14 Г/л). Аналогич-

ная картина прослеживалась в группе Сахабактисубтил — доза 2 ( $80 \times 10^9$  КОЕ *B.subtilis*/животное).

У самок крыс CD сразу после отмены введения Сахабактисубтила в обеих дозах отклонений в тромбоцитарных и эритроцитарных показателях не выявлено. В лейкограмме у самок в группах Сахабактисубтил — доза 1 ( $20 \times 10^9$  КОЕ *B.subtilis*/животное) и Сахабактисубтил — доза 2 ( $80 \times 10^9$  КОЕ *B.subtilis*/животное), в противоположность самцам, наблюдалось увеличение доли ( $4,6 \pm 0,9\%$ ,  $6,6 \pm 1,9\%$ ) и абсолютного содержания сегментоядерных нейтрофилов ( $0,50 \pm 0,06$  Г/л,  $0,68 \pm 0,21$  Г/л) относительно контрольных значений ( $3,0 \pm 1,2\%$ ,  $0,34 \pm 0,13$  Г/л) и тенденция к снижению содержания лимфоцитов. Аналогичное картина сохранялась у самок спустя 2 недели после отмены введения, причем в группе Сахабактисубтил — доза 1 ( $20 \times 10^9$  КОЕ *B.subtilis*/животное) отличие было достоверно, в группе Сахабактисубтил — доза 2 ( $80 \times 10^9$  КОЕ *B.subtilis*/животное) отмечалась только тенденция.

Поскольку выявленные изменения в лейкограмме у самцов и самок имели противоположную направленность, они, по всей видимости, случайны и не связаны с действием препарата, а обусловлены индивидуальной вариабельностью показателей и малыми выборками животных.

На 15 и 29 день исследования у самцов в группе, получавшей тестируемый препарат в двух дозах, средние значения изучаемых биохимических параметров статистически не отличались между группами.

У самок на 29 день исследования наблюдалось некоторое снижение уровня мочевины в группе, получавшей Сахабактисубтил — доза 1 ( $20 \times 10^9$  КОЕ *B.subtilis*/животное), по сравнению с группой, получавшей Сахабактисубтил — доза 2 ( $80 \times 10^9$  КОЕ *B.subtilis*/животное), однако статистически значимых отличий в значениях этого параметра от контрольной группы обнаружено не было.

Статистически значимых различий по массе органов между животными, получавшими тестируемый препарат, и контрольными животными, получавшими физиологический раствор, по массе органов ни у самцов, ни у самок выявлено не было.

При плановой некропсии животных в ходе визуального осмотра внешне-го состояния тела, внутренних поверхностей и проходов, полости черепа, грудной, брюшной и тазовой полости с находящимися в них органами и тканями, шеи с органами и тканями, каркаса и скелетно-мышечной системы, а также мест введения препарата патологические изменения зафиксированы не были.

В соответствии с планом исследования проведен микроскопический анализ сердца, легких, головного мозга, печени, почек, надпочечников, яичников, семенников, тимуса, селезенки, брыжеечных лимфоузлов, желудка, двенадцатиперстной, тощей, подвздошной, слепой и ободочной кишки. В процессе проведения микроскопического анализа в перечисленных органах, за исключением брыжеечных лимфоузлов, отклонений от нормы и повреждений выявлено не было.

Со стороны брыжеечных лимфоузлов у одного самца, получавшего тестируемый препарат в дозе  $20 \times 10^9$ , и у двух самок, получавших препарат в дозе  $80 \times 10^9$  КОЕ *B.subtilis*/животное, наблюдалось умеренное расширение мозговых синусов и повышение количества макрофагов в них, что указывает на активизацию ретикулоэндотелиальной системы. В данном случае причиной активизации этой системы, вероятнее всего, явилась повышенная индивидуальная чувствительность организма у отдельных животных к тестируемому

препарату, и это способствовало более выраженному проявлению барьерной и фагоцитарной функции со стороны ретикулоэндотелиальной системы.

Отсутствие токсичности препарата Сахабактисубтил, состоящего из штаммов бактерий *B.subtilis* ТНП-3 и *B.subtilis* ТНП-5, ранее установлено у беспородных мышей при разработке лекарственного средства — пробиотика для ветеринарного применения [14]. В настоящее время препарат утвержден Россельхознадзором и широко используется в ветеринарной практике для профилактики и лечения желудочно-кишечных болезней. Доклинические испытания на мышах CD-1 показали отсутствие токсичности при однократном внутрижелудочном применении [4]. В результате предыдущих исследований максимальной толерантная доза препарата Сахабактисубтил при его однократном внутрижелудочном введении мышам CD-1 и крысам CD достигнута не была, ввиду отсутствия смертности или какого-либо токсического эффекта в максимально допущенных для введения объемах.

Результаты исследований показали, что тестируемый оригинальный препарат Сахабактисубтил из штаммов бактерий *B.subtilis* ТНП-3 и *B.subtilis* ТНП-5 в исследуемых дозах является безопасным и не оказывает потенциально токсического эффекта при многократном внутрижелудочном введении крысам CD. Полученные данные могут быть учтены при разработке лекарственного препарата для медицинского применения из штаммов *B.subtilis* ТНП-3 и *B.subtilis* ТНП-5.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Егорова Т.А., Ленкова Т.Н., Ильина Л.А., Ёылдырым Е.А., Никонов И.Н., Филиппова В.А., Лаптев Г.Ю., Новикова Н.И., Грозина А.А., Манукян В.А., Фисинин В.И., Егоров И.А. Влияние пробиотиков на основе *Saccharomyces* sp. и *Bacillus subtilis* на бактериальное сообщество слепых отростков кишечника и продуктивность цыплят-бройлеров. *Сельскохозяйственная биология*. 2016, 51 (6): 891-902.
2. Леванова Г.Ф., Лазовская А.Л., Кашников С.Ю. Плазмидный анализ бактерий рода *Bacillus*, используемых в конструировании пробиотиков. *Журн. микробиол.* 2007, 5: 77-79.
3. Михайлова Н.М., Блинкова Л.П., Гатауллин А.Г. Биологические основы изолятов *Bacillus subtilis*. *Журн. микробиол.* 2007, 4: 41-46.
4. Неустроев М.П., Тарабукина Н.П., Степанова А.М., Мурашев А.М. Изучение токсичности пробиотика из штаммов *Bacillus subtilis* на белых мышах. Новые материалы и технологии в условиях Арктики. Ставрополь. 2015, с. 118-122.
5. Неустроев М.П., Тарабукина Н.П., Степанова А.М., Парникова С.И., Петрова С.Г., Жирков А.Д., Романова У.Н., Иванова Л.И. Бактерицидное действие штаммов бактерий *Bacillus subtilis* к возбудителям лептоспироза. *Российская сельскохозяйственная наука*. 2015, 4: 63-65.
6. Панин А.Н., Малик Н.И., Илаев О.С. Пробиотики в животноводстве — состояние и перспективы. *Ветеринария*. 2012, 3: 3-8.
7. Похиленко В.Д., Перельгин В.В. Пробиотики на основе спорообразующих бактерий и их безвредность. *Химическая и биологическая безопасность*. 2007, 32-33 (2-3): 20-40.
8. Псахис И.Б., Маковская Т.Е. Современные возможности и перспективы использования пробиотиков группы самоэлиминирующихся антагонистов в терапии инфекционных заболеваний. *Здоровье ребенка*. 2014, 14 (56): 134-138.
9. Alizadeh M., Rodriguez-Lecompte J.C., Yitbarek A.C. et al. Effect of yeast-derived products on systemic innate immune response of broiler chickens following a lipopolysaccharide challenge. *Poultry Sci.* 2016, 95 (10): 2266-2273.
10. Barboza-Corona J.E., Fuente-Salcido N., Flva-Murillo N. et al. Activity of bacteriocins synthesized by *Bacillus thuringiensis* against *Staphylococcus aureus* isolated associated to bovine mastitis. *Veterinary Microbiology*. 2009, 138: 179-183.
11. Czerwinski J., Hojberg O., Smulikowka S. et al. Influence of dietary peas and organic acids

- and probiotic supplementation on performance and caecal microbial ecology of broiler chickens. *Brit. Poultry Sci.* 2010, 51 (2): 258-269.
12. Hong H.A., Huang J.M., Khaneja R. et al. The safety of *Bacillus subtilis* and *Bacillus indicus* as food probiotics. *J. Appl. Microbiol.* 2008, 105: 510-520.
  13. Rajput I.R., Hussain A., Zhang X. et al. *Saccharomyces boulardii* and *Bacillus subtilis* B10 modulate TLRs mediated signaling to induce immunity by chicken BMDCg. *J. Cell. Biochem.* 2014, 115 (1): 189-198.
  14. Tarabukina N.P., Neustroev M.P., Fedorova M.P., Parnicova S.I. Broad spectrum probiotic (*Sachabactisubtil*) recovered from Yakutia permatsoost soil. *Veterinary World-Open Access. Per. Rev. J.* 2011, 5: 222-224.
  15. Urdaci M.C., Bressollier P., Pinchuki I. *Bacillus clausii* probiotic strains: antimicrobial and immunomodulatory activities. *J. Clin. Gastroenterol.* 2004, 38: 86-90.

Поступила 15.03.17

Контактная информация: Неустроев Михаил Петрович, д-р вет. наук,  
677001, Якутск, ул. Бестужева-Марлинского, 23, кор. 1, р.т. (411)221-00-95

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2017

Т.Ю.Загоскина<sup>1</sup>, Е.Ю.Марков<sup>1</sup>, Е.А.Чапоргина<sup>1</sup>, Ю.О.Попова<sup>1</sup>,  
Т.М.Долгова<sup>1</sup>, О.В.Гаврилова<sup>1</sup>, Т.С.Тайкова<sup>1</sup>, А.В.Никитина<sup>2</sup>,  
В.Г.Помелова<sup>2</sup>, Н.С.Осин<sup>3</sup>, С.В.Балахонов<sup>1</sup>

## СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ЭФФЕКТИВНОСТИ ТВЕРДОФАЗНЫХ МЕТОДОВ ИММУНОДЕТЕКЦИИ БОТУЛИНИЧЕСКОГО ТОКСИНА В СЫВОРОТКЕ КРОВИ БОЛЬНОГО С ДИАГНОЗОМ «БОТУЛИЗМ»

<sup>1</sup>Иркутский научно-исследовательский противочумный институт; <sup>2</sup>ГосНИИ биологического приборостроения; <sup>3</sup>ЗАО «Иммуноскрин», Москва

*Цель.* Сравнение эффективности твердофазных методов иммунодетекции ботулинического токсина в сыворотке крови больного с диагнозом «ботулизм»: дот-иммуноанализа с использованием специфических противоботулинических антител (АТ), меченных наночастицами коллоидного серебра, фосфоресцентного анализа (ФОСФАН) с использованием стрептавидина, меченного платинокопропорфирином (PtКП) и полистирольными наночастицами, содержащими хелатный комплекс ионов европия с нафтоилтрифторацетонатом (НЧ-Еу). *Материалы и методы.* В работе использовали меченные наночастицами серебра IgG, выделенные из коммерческой диагностической поливалентной сыворотки против ботулотоксинов типов А, В, С, Е, F производства НПО «Аллерген» (Ставрополь) активностью 5000 — 10 000 МЕ, и конъюгированные с биотином коммерческие моноклональные антитела к ботулотоксину А, поликлональные моноспецифические АТ к ботулотоксину В и ботулотоксину Е и поливалентный иммуноглобулин к ботулотоксинам А, В, С, Е, F. Детекцию ботулотоксина в клиническом материале осуществляли в дот-иммуноанализе на нитроцеллюлозной мембране и методом ФОСФАН в экспериментальной тест-системе с применением двух детекторных систем на основе стрептавидина: PtКП и НЧ-Еу. *Результаты.* В сыворотке крови больного ботулизмом обнаружен ботулотоксин с использованием обоих разработанных методов иммунодетекции. Метод ФОСФАН позволил идентифицировать серотип В ботулотоксина, что совпало с полученным результатом в реакции биологической нейтрализации ботулотоксина. Чувствительность ФОСФАН с системой детекции на основе люминесцентных наночастиц НЧ-Еу была выше, чем с метчиком PtКП. *Заключение.* Разработанные методы (ФОСФАН и дот-иммуноанализ) отличаются высокой специфичностью и чувствительностью и могут быть рекомендованы для экспресс-детекции ботулинического токсина в клиническом материале.

Журн. микробиол., 2017, № 5, С. 64—70

Ключевые слова: ботулинический токсин, мультиплексный фосфоресцентный анализ (ФОСФАН), дот-иммуноанализ, наночастицы серебра, люминесцентные наночастицы, хелат европия (Еу), Pt копропорфирин