

## ОЦЕНКА БИОЛОГИЧЕСКОЙ И АНТАГОНИСТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ПРЕПАРАТОВ НА ОСНОВЕ ИММОБИЛИЗОВАННЫХ БАКТЕРИЙ

**А.В. КОРОЧИНСКИЙ<sup>1</sup>**  
**Э.Ф. СТЕПАНОВА<sup>1</sup>**  
**Ю.И. ОСТРОУМОВ<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> *Пятигорская государственная фармацевтическая академия*

<sup>2</sup> *Институт инженерной иммунологии, г. Москва*

*e-mail: a.v.korochinskiy@mail.ru*

В настоящей статье экспериментально проведена и обоснована оценка биологической активности и сохранности лекарственных препаратов на основе бактерий, иммобилизованных альгинатом натрия.

Ключевые слова: иммобилизация, альгинат кальция, антагонистическая активность, биоагент, биоспорин, хитозан.

**Введение.** В последние годы получили распространение новые подходы к лечению, связанные с восстановлением естественной экологии организма и основанные на использовании активных биологических продуктов. Одним из аспектов такого подхода является нормализация измененного микробного пейзажа организма при помощи бактериальных и биопрепаратов. В настоящее время усилиями новых промышленных и коммерческих структур традиционно существовавший дефицит этих препаратов в основном снят. Но их применение, как правило, основано на экстенсивной схеме дозирования, заключающейся в использовании значительного количества бактерий. Это связано с необходимостью обеспечения прохождения терапевтически значимых концентраций микроорганизмов через среду желудка, ведь именно там они подвергаются губительному воздействию ряда гидролитических ферментов и кислоты [1].

Одним из вариантов решения этой проблемы стало применение различных методов защиты вводимой клеточной массы пробиотика. Наиболее простым и часто применяемым технологическим приемом является использование капсул с ацидорезистентной оболочкой. Другой, более сложный, прием заключается в использовании различных носителей, которые пространственно ограничивают клетки микроорганизмов. Данный метод был предложен Кирстенем и Бьюком и предусматривает промышленное применение [2].

Наше внимание привлекла иммобилизация клеток (адсорбционная и пространственная) с дальнейшей модификацией поверхности полученной лекарственной формы, что способствует повышению стрессоустойчивости клеток в неблагоприятных условиях.

В настоящее время увеличивается интерес к совершенствованию препаратов пробиотиков путём иммобилизации клеток микроорганизмов. Одним из наиболее перспективных и привлекательных способов иммобилизации является включение живых клеток в структуру гелей альгинатов [3, 4].

Полученная форма, состоящая из адсорбированных клеток, пространственно ограниченных гелями полимеров, имеет достаточно большие перспективы как самостоятельная форма выпуска и как промежуточный продукт, который после дополнительной относительно несложной модификации возможно использовать не только в составе твердых, но и жидких лекарственных форм, что расширит круг выпускаемых в настоящее время пробиотиков, а также значительно улучшит их потребительские свойства.

Поэтому **целью** настоящих исследований является использование методик оценки биологической и антагонистической активности для лекарственных препаратов на основе бактерий, иммобилизованных альгинатом натрия.

**Материалы и методы.** Возможно использование активированного угля в качестве адсорбента, а также природных биodeградируемых нетоксичных полисахари-



дов, таких как хитозан и альгинат натрия различных марок. Такая форма примечательна тем, что за счет сорбции на частицах угля удается создать микроколонии бактерий, находящиеся в особом физико-химическом окружении, что повышает их антагонистическую активность, а модификация раствором хитозана создает защиту от агрессивных факторов среды желудка.

В качестве носителя нами использовался чистый альгинат, альгинат с микрочастицами активированного угля, а также применялась обработка поверхности получаемых гранул раствором хитозана

В качестве тест-культур использовали *Staphilococcus aureus* штамм 209, *Shigella sonnei* штамм 5069, *Proteus vulgaris* штамм 177, *Candida albicans* штамм 885-653 из коллекции ГИСК им. Тарасевича.

**Результаты исследования и их обсуждение.** В результате проведенных исследований было показано, что обработка альгинатных капсул раствором хитозана обеспечивала улучшение качества и стабильности капсул. Это можно объяснить появлением оболочки полиэлектролитного комплекса на поверхности капсул и возможным дальнейшим распространением реакции между макромолекулами полиэлектролитов вглубь ядра гранул.

Оценку биологической активности (биологической концентрации – БК) и сохраняемости препаратов на основе бактерий, иммобилизованных альгинатом кальция, проводили путем определения биологической концентрации микроорганизмов методом посева на плотную питательную среду (среда Гаузе). Общую концентрацию микроорганизмов оценивали по счету в камере Горяева и по оптической концентрации, определенной по стандарту мутности.

Антагонистическую активность оценивали методом отсроченного антагонизма по величине зоны задержки роста тест-культур (в миллиметрах), которую считали:

- нулевой при зоне задержки роста до 5 мм;
- низкой – от 5 до 10 мм;
- средней – от 10 до 15 мм;
- высокой – от 15 до 20 мм;
- очень высокой – более 20 мм [5].

При иммобилизации клеток по указанной методике образуются сферические частицы (гранулы), имеющие одинаковый диаметр. В качестве носителя нами использовался чистый альгинат, альгинат с микрочастицами активированного угля (для дополнительной адсорбции клеток), а также применялась обработка поверхности гранул раствором хитозана.

Указанные показатели определяли для препаратов, приготовленных на основе коммерческого препарата БИОСПОРИН (образец 1) и на основе концентрированной суспензии *V.subtilis* шт. 3, приготовленной в лабораторных условиях на плотной питательной среде и ресуспендированной в гипертоническом растворе ( $ОК=7,6 \cdot 10^{10}$  сп\*г<sup>-1</sup>,  $БК=7,2 \cdot 10^{10}$  сп\*г<sup>-1</sup>,  $СО=9,2\%$ ) (образец 2). Кроме того, указанные показатели определяли для тех же препаратов на конечные сроки хранения, которые составили для образца 1 практически 4 месяца, а для образца 2 – более 1 месяца.

Таблица 1

#### Характеристики общей и биологической концентрации препаратов

№ п/п	Наименование препарата	Концентрация микроорганизмов, *10 <sup>9</sup> сп*г <sup>-1</sup>		
		Общая по стандарту мутности	Общая по счету в камере Горяева	БК
1	Образец 1	0,4	0,37	0,32 ± 0,06
2	Образец 1 (хр.)	0,5	0,42	0,36 ± 0,07
3	Образец 2	55	52	56 ± 11
4	Образец 2 (хр.)	60	54	55 ± 8

Полученные результаты свидетельствуют о высокой сохраняемости микроорганизмов, входящих в состав препаративной формы как на стадии приготовления, так и в процессе хранения. Некоторая девиация показателя общей концентрации объясняется значительной методической погрешностью их определения.



Практическое отсутствие инактивации биоагента в составе препарата в процессе кратковременного хранения позволяет предположить, что препарат будет характеризоваться высокой устойчивостью при хранении в течение одного года и более.

Результаты исследования антагонистической активности препаратов приведены в табл. 2.

Таблица 2

**Показатели антагонистической активности препаратов в отношении регламентированных тест-штаммов**

№ п/п	Наименование препарата	Зона задержки тест-культур, мм			
		S.aureus 209	Sh.sonnei 5069	P.vulgaris 177	C.albicans 885-653
1	Образец 1	32,9 ± 2,9	17,2 ± 1,8	20,2 ± 3,1	32,2 ± 2,3
2	Образец 1 (хр.)	31,2 ± 3,1	16,4 ± 2,2	20,0 ± 2,2	32,3 ± 3,1
3	Образец 2	33,6 ± 3,4	18,0 ± 2,1	21,3 ± 3,4	33,1 ± 3,0
4	Образец 2 (хр.)	32,5 ± 3,5	17,3 ± 2,3	21,1 ± 2,8	33,3 ± 3,5

Данные табл. 2 свидетельствуют о сохранении микроорганизмами высокой антагонистической активности по отношению к тест-культурам патогенных и условно-патогенных микроорганизмов, что позволяет сделать вывод об отсутствии в ходе приготовления препаративных форм технологических воздействий, способных существенно изменить свойства биоагента.

**Выводы.** Таким образом, впервые известные методики, используемые для определения биологической и антагонистической активности различных препаратов, были апробированы на моделях лекарственных препаратов, полученных на основе иммобилизованных бактерий, что позволит осуществлять контроль активности в отношении некоторых выпускаемых пробиотиков, лекарственные формы которых произведены на основе иммобилизованных бактерий

**Литература**

1. Демаков, В.А. Иммобилизация клеток микроорганизмов: биотехнологические аспекты / В.А. Демаков, Ю.Г. Максимова, А.Ю. Максимов / Биотехнология. – 2008. – № 2. – С. 30.
2. Ананьева, Н.В. Совершенствование технологии пробиотических культур прямого внесения для молочных продуктов : автореф. дис. ... канд. техн. наук / Н.В. Ананьева ; ГОУ ВПО «Московский государственный университет прикладной биотехнологии», 2007.
3. Anil, K.A. Recent advances in microencapsulation of probiotics for industrial applications and targeted delivery / A.K. Anil, H. Singh // Singh Trends in Food Science & Technology. – 2007. – №18. – P. 240-251.
4. Иммобилизованные клетки и ферменты. Методы / пер. с англ. ; под ред. Дж. Вудворда.– М.: Мир, 1988. – С.22.
5. ФС 42-3476-98. Биоспорин. Фармакопейная статья.

**ASSESSMENT OF BIOLOGICAL AND ANTAGONISTIC ACTIVITY OF PREPARATIONS ON THE BASIS OF THE IMMOBILIZED BACTERIA**

**A.V. KOROCHINSKIY<sup>1</sup>**

**E.F. STEPANOVA<sup>1</sup>**

**U.I. OSTROUMOV<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> *Pyatigorsk State Pharmaceutical Academy*

<sup>2</sup> *Institute of engineering immunology, Moscow*

*e-mail: a.v.korochinskii@mail.ru*

In the present article the assessment of biological activity and safety of medicines on the basis of the bacteria, immobilized alginat sodium is carried experimentally out and proved.

Key words: immobilization, alginat calcium, antagonistic activity, bioagent, biosporin, chitosan, bioactivity, biocompatibility, bioresistibility.