

**ІНСТИТУТ МІКРОБІОЛОГІЇ І ВІРУСОЛОГІЇ
ім.Д.К.ЗАБОЛОТНОГО НАН УКРАЇНИ**

СОРОКУЛОВА ПРИНА БОРИСІВНА

УДК 579.852.11: 615.331

**ТЕОРЕТИЧНЕ ОБГРУНТУВАННЯ І ПРАКТИКА ЗАСТОСУВАННЯ БАКТЕРІЙ РОДУ
BACILLUS ДЛЯ КОНСТРУЮВАННЯ НОВИХ ПРОБІОТИКІВ**

03.00.07 - мікробіологія

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т

дисертації на здобуття наукового ступеня

доктора біологічних наук

Київ - 1999

Дисертацією є рукопис

Робота виконана у відділі антибіотиків Інституту мікробіології і вірусології ім.Д.К.Заболотного НАН України

Науковий консультант: доктор медичних наук, професор, академік НАН України
Смірнов Валерій Веніамінович, завідувач відділу
антибіотиків Інституту мікробіології і вірусології
ім.Д.К.Заболотного НАН України

Офіційні опоненти:

доктор біологічних наук, чл.-кор. НАН України, професор **Мацелюх Богдан Павлович**,
Інститут мікробіології і вірусології ім.Д.К.Заболотного НАН України, завідувач відділу
генетики мікроорганізмів;

доктор біологічних наук, професор **Федоровська Олена Олексіївна**, Київський
науково-дослідний інститут гематології та переливання крові МОЗ України, завідувач
лабораторії мікробіології та імунних препаратів крові;

доктор медичних наук, професор **Кременчуцький Генадій Миколайович**,
Дніпропетровська державна медична академія, завідувач кафедри мікробіології і епідеміології

Провідна установа:

Київський науково-дослідний інститут епідеміології і інфекційних хвороб ім.
Л.В.Громашевського МОЗ України

Захист відбудеться “ 16 ” червня 1999 р. о 10 годині на засіданні спеціалізованої вченої ради
Д26.233.01 Інституту мікробіології і вірусології ім. Д.К.Заболотного НАН України (252143,
м.Київ, вул.Заболотного, 154)

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці Інституту мікробіології і вірусології ім.
Д.К.Заболотного НАН України (252143, м.Київ, вул.Заболотного, 154)

Автореферат розісланий “ 11 ” травня 1999 р.

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради,
канд. біол. наук

Пуріш Л.М.

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми.

Фундаментальні дослідження сучасної біологічної і медичної науки, успіхи в пізнанні багатогранних аспектів взаємовідношень макро- і мікроорганізмів дозволили розробити та впровадити в практику біопрепарати-пробіотики, основу яких складають живі мікробні культури.

В наш час, який деякі вчені (Lyons, 1986) називають “прийдешньою епохою пробіотиків”, біопрепарати на основі живих мікробних культур широко застосовуються в медицині та ветеринарії для корекції мікрофлори. Vanbelle et al (1990) відмічають, що тільки в країнах ЄС зареєстровано більш як 20 різних пробіотиків. Однак є потреба в нових біопрепаратах, обумовлена обмеженістю спектра специфічної активності відомих пробіотиків і різноманітністю мікроекологічних порушень нормальної мікрофлори, що викликають дисбактеріоз.

Перспективним напрямком розробки нових біопрепаратів є застосування бактерій роду *Bacillus*. Ці мікроорганізми, завдяки високим адаптивним можливостям, широко розповсюджені в природі, зокрема, в тих об'єктах, з якими людина контактує найтісніше (харчові продукти, вода, повітря та інш.) (Смирнов и др., 1982; Matches et al., 1987; Odunfa, Ouwole, 1986). Завдяки цьому бацили постійно і в значній кількості надходять до організму людини і, оскільки, є стійкими до літичних і травних ферментів, зберігають життєздатність на всьому протязі шлунково-кишкового тракту. Таким чином, аеробні спороутворюючі бактерії роду *Bacillus* є одним з важливих компонентів екзогенної мікрофлори. Серед інших представників екзогенної мікрофлори бацили мають ряд переваг, які дозволяють вважати їх найефективнішими для конструювання нових біопрепаратів:

- 1) ці бактерії (крім *B.anthraxis* і *B.cereus*), як правило, безпечні для макроорганізму;
- 2) серед них можна відібрати штами, антагоністична активність яких більш виражена і проявляється щодо більш широкого спектра патогенних та умовно патогенних мікроорганізмів, ніж у інших представників екзогенної та ендогенної мікрофлори;
- 3) бацили характеризуються високою ферментативною активністю, що може обумовити регулювання та стимулювання травлення, протиалергенну та антитоксичну дію;
- 4) ці мікроорганізми технологічні у виробництві, стабільні при зберіганні;
- 5) вони екологічно безпечні.

Важливо, що генетичні особливості бацил добре вивчено, і тому вони є перспективною системою для клонування чужорідних генів. У наш час методами генетичної інженерії на основі аеробних спороутворюючих бактерій одержано суперпродуценти біологічно активних речовин. Це відкриває перспективу конструювання штамів бацил з запланованими властивостями для використання їх у складі нових пробіотиків.

Таким чином, аеробні спороутворюючі бактерії роду *Bacillus* є перспективною групою для розробки на їх основі принципово нових високоефективних біопрепаратів, у тому числі з заданими властивостями методами генетичної інженерії.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.

Роботу виконано згідно з планами науково-дослідних робіт Інституту мікробіології і вірусології ім.Д.К.Заболотного НАН України, а також програмами ДКНТ (проект 01.11.09/001-92 “Розробити препарат біоспорин, призначений для профілактики та лікування у людей дисбактеріозів і гострих шлунково-кишкових захворювань, обумовлених патогенними та умовно патогенними мікроорганізмами”; проект 01.02.02/018-92 “Розробити новий екологічно чистий біопрепарат з антибактеріальною та антивірусною активністю”; проект 05.02/106 “Вивчення регуляції синтезу ендогенного інтерферону під впливом *B.subtilis* в клітинах різних систем організму теплокровних”), ДНТП “Імунопрофілактика населення” (проект 11 “Розробка методів підвищення ефективності застосування імунобіологічних препаратів та впровадження

їх у практику охорони здоров'я”), Міннауки України (проект 02.02/5179 “Впровадити в медичну практику принципово новий пробіотик субалін комплексної дії”).

Мета і задачі дослідження.

Метою роботи було створення на основі аеробних спороутворюючих бактерій роду *Bacillus* принципово нових пробіотиків та впровадження їх в медичну та ветеринарну практику.

У відповідності до поставленої мети було необхідно розв'язати такі задачі:

- 1) всебічно вивчити біологічні властивості штамів бацил, перспективних для включення до складу пробіотика;
- 2) дослідити безпечність відібраних бактеріальних культур і розробленого біопрепарату;
- 3) провести клінічне вивчення ефективності препарату;
- 4) розробити технологію виробництва препарату та методи його контролю ;
- 5) провести порівняльне вивчення нового препарату та комерційних пробіотиків на основі бацил;
- 6) методами генетичної інженерії сконструювати штам *B.subtilis*, який продукує α -2 інтерферон людини, і на його основі розробити пробіотик з антибактеріальними та антивірусними властивостями;
- 7) вивчити деякі аспекти механізму дії пробіотиків з бацил;
- 8) розробити нормативну документацію на препарати та впровадити пробіотики в практику.

Наукова новизна одержаних результатів.

-Теоретично обґрунтовано та експериментально доведено доцільність створення нових пробіотиків на основі аеробних спороутворюючих бактерій роду *Bacillus*.

-Розроблено наукові засади конструювання рекомбінантних бацил з запланованими властивостями.

-Вперше на основі аеробних спороутворюючих бактерій роду *Bacillus* розроблено принципово новий пробіотик біоспорин.

-Показано, що біоспорин характеризується унікальним спектром антагоністичної активності: він ефективний проти таких мікроорганізмів (*Candida* spp., *Campylobacter* spp., *Yersinia* spp.), на які не діють інші пробіотики.

-Експериментально обґрунтовано принципи експрес-діагностики справжності культур *B.subtilis* 3 і *B.licheniformis* 31, що складають основу біоспорину.

-Вперше методами генетичної інженерії сконструйовано рекомбінантний пробіотик субалін, який характеризується антибактеріальною та антивірусною активністю.

-Показано ефективність перорального застосування субаліну при експериментальних вірусних інфекціях.

-Встановлено значення транслокації бактерій-пробіотиків для стимуляції імунної резистентності макроорганізму.

-Виявлено стимуляцію специфічної імунної відповіді при пероральному застосуванні розроблених пробіотиків під час вакцинації.

Практичне значення одержаних результатів.

У медичну практику впроваджено принципово новий пробіотик біоспорин (патент України № 689 і патент Російської Федерації № 1722502). Біоспорин відрізняється від інших зарубіжних комерційних пробіотиків, які базуються на аеробних спороутворюючих бактеріях (цереобіоген, бактисубтил, ентерогермін). При порівняльному вивченні біоспорину та цих препаратів встановлено, що біоспорин характеризується унікальним спектром антагоністичної активності і в той же час є найбезпечнішим серед них.

При вивченні клінічної ефективності біоспорину в медичних закладах Києва, Дніпропетровська, Москви на різних контингентах хворих показано безпечність біоспорину, його високу лікувальну ефективність. Встановлено повну елімінацію сальмонел та шигел у всіх хворих, значне зниження рівня чи повна елімінація умовно патогенних ентеробактерій, включаючи патогенну кишкову паличку (у 73,9 и 64% хворих, відповідно), патогенних стафілококів (у 75% хворих) та грибів роду *Candida* (у 75% хворих).

Наказом Міністерства охорони здоров'я України № 219 від 22.10.93 р. та Міністерства охорони здоров'я Російської Федерації № 353 від 29.12.92 р. біоспорин дозволено до застосування в медичній практиці.

Біоспорин зареєстровано в Україні (№ 12.22.10.93) та в Російській Федерації (№ 010094). Затверджено Фармакопейні статті на біоспорин в Україні (ФС 42У- 200/8-142-97) і в Російській Федерації (ФС 42-3476-98), інструкції по застосуванню препарату, регламенти виробництва біоспорину.

Промисловий випуск біоспорину в Україні проводиться ВАТ “Дніпрофарм”. В 1993-98 р.р. випущено більш як 5 млн. ампул препарату. За цей період не зареєстровано випадків промислового браку, жодної реклаमाції на завод не поступало.

За цикл робіт “Теоретичне обґрунтування, конструювання, освоєння виробничого випуску та впровадження в клінічну практику принципово нового медичного пробіотика - біоспорин” присуджено Державну премію України в галузі науки і техніки за 1995 р. (диплом № 4050).

Ліцензію на біоспорин продано в Російську Федерацію і промисловий випуск біоспорину освоєний Центром науково-технічних проблем біологічного захисту НДІ мікробіології МО РФ (м.Єкатеринбург).

У ветеринарну практику впроваджено новий рекомбінантний пробіотик субалін, який не має аналогів у світі (патенти Російської Федерації № 1839459, 2035185). Субалін рекомендовано для профілактики та лікування хвороб бактеріальної та вірусної етіології у тварин (реєстраційний № ПВР1.03.0728-98). Затверджено технічні умови на субалін, настанову по застосуванню препарату у ветеринарії. Виробництво субаліну здійснюється ВАТ “Дніпрофарм”.

В Україні закінчуються клінічні випробування ефективності субаліну, які проводилися відповідно до рішення Комітету з питань імунобіологічних препаратів МОЗ України згідно з затвердженою програмою.

Особистий внесок здобувача.

Автору належить: розробка концепції та напрямку досліджень, безпосереднє проведення експериментальних досліджень, аналіз і узагальнення одержаних даних, формулювання висновків. У роботі використані матеріали, в основному отримані особисто автором, а також у співавторстві.

Окремі дослідження було проведено разом з С.Р.Резником (деякі етапи розробки біоспорину); В.О.Белявською (конструювання рекомбінантного штама *V.subtilis*); В.М. Крамаровим (вивчення сайт-специфічних ендонуклеаз бактерій роду *Bacillus*); С.Л.Рибалко, А.В.Шапіро (вивчення антивірусної активності пробіотиків, тестування інтерферону), А.В.Руденко (вивчення чутливості бацил до антибіотиків), Г.О.Орловою (одержання люмінесцентних сироваток), Н.М.Грачовою, В.П.Виноградовим, А.В.Тофаном (проведення клінічних випробувань біоспорину). Всім співавторам висловлюю глибоку подяку.

Апробація результатів дисертації.

Основні результати проведених досліджень були представлені на: VI і VII з'їздах Українського мікробіологічного товариства (Донецьк, 1984; Чернівці, 1989); VII з'їзді Всесоюзного мікробіологічного товариства (Алма-Ата, 1985); XI Українському

республіканському з'їзді мікробіологів, епідеміологів, паразитологів (Одеса, 1985); всесоюзних конференціях “Биосинтез вторичных метаболитов” (Пушино, 1987), “Колонизационная резистентность и химиотерапевтические антибактериальные препараты” (Москва, 1988), “Биосинтез ферментов микроорганизмами” (Ташкент, 1988); “Молекулярные механизмы генетических процессов” (Москва, 1990); “Микробиологические и биотехнологические основы интенсификации растениеводства и кормопроизводства” (Алма-Ата, 1990); “Биологические основы высокой продуктивности сельскохозяйственных животных” (Боровськ, 1990); всеросійських конференціях “Новые направления биотехнологии” (Пушино, 1994); “Дисбактериозы и эубиотики” (Москва, 1996); IV Російському національному конгресі “Человек и лекарство” (Москва, 1997); науково-практичній конференції “Перспективы использования эубиотика “Биоспорин” в практике здравоохранения и военно-медицинской службы” (Єкатеринбург, 1997); міжнародній конференції,

присвяченій пам'яті академіка А.А.Баєва (Москва, 1996); Міжнародних конгресах “Bacteriology & Mycology” (Осака, Японія, 1990); “Industrial Use of Enzymes” (Піза, Італія 1990); “Genetics of Industrial Microorganisms” (Страсбург, Франція, 1990); VII Міжнародному конгресі з інфекційних хвороб (Гонконг, 1996); VI Міжнародній конференції з медицини (Акапулько, Мексика, 1995); IX Міжнародній конференції по бацилам (Лозанна, Швейцарія, 1997).

Публікації.

Результати дисертації викладено у 63 наукових працях, серед яких 1 методичні рекомендації, 20 статей в наукових журналах, 30 тез у збірниках конференцій, 9 патентів, 3 позитивних рішення про видачу патентів.

Структура і обсяг дисертації.

Дисертація складається зі вступу, 11 розділів основної частини, узагальнення результатів досліджень, висновків, списку використаних літературних джерел.

Роботу викладено на 377 сторінках, ілюстровано 49 таблицями, 42 малюнками (52 на окремих аркушах). Список використаної літератури включає 520 джерел, у тому числі 337-іноземними мовами.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ

В трьох розділах огляду літератури представлено характеристику сучасного стану проблеми пробіотиків і теоретично обґрунтовано підходи до конструювання пробіотиків на основі бактерій роду *Bacillus*.

Розділ 4. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ.

Об'єктами досліджень були 215 штамів аеробних спороутворюючих бактерій роду *Bacillus* з музею Інституту мікробіології і вірусології НАН України, а також близько 200 штамів мікроорганізмів інших таксономічних груп. Експериментальні дослідження проведено на лабораторних тваринах (у тому числі інбредних), мавпах макаках-резус, сільськогосподарських тваринах.

У роботі використовували:

- аллантаїсні культури вірусів грипу А/Г/1/68(Н3Н2); А/PR8(Н0Н1);
- тканинні культури вірусів: герпесу I антигенного типу (штам УС) і II антигенного типу (штам MS); енцефаломієліту коней; везикулярного стоматиту (штам Індіана).

Еталонні штами одержували з колекції вірусів Інституту вірусології ім.Д.І.Івановського АМН РФ, вірус енцефаломієліту коней - з колекції культур ДНЦ ВБ “Вектор”.

Культури клітин:

- диплоїдні клітини фібробластів людини (ДФЛ ДК-58);
- перевивні культури фібробластів миші (L-929);
- перевивні культури клітин нирки свині (СПЕВ)

Плазмідні: pPL608 , pBMB 104 , pBMB 105, pBR322, pUC19 - одержані з ДНЦ ВБ “Вектор” та Інституту білка АН СРСР.

Чутливість бацил до антимікробних препаратів вивчали диско-дифузійним методом (Меньшиков, 1987).

Динаміку росту мікроорганізмів у присутності антимікробних препаратів вивчали за допомогою швидкісної автоматизованої системи для мікробіологічних і наукових досліджень MS-2 фірми “Abbott”.

Вивчення мікробіоценозу кишечника проводили згідно з методичними рекомендаціями (Грачева и др., 1986).

При очищенні сайт-специфічних ендонуклеаз (ССЕ) використовували фосфоцелюлозу Р-II (“Whatman”, США); оксиапатит, який синтезували згідно з описаною методикою (Mazin, 1974); голубу сефарозу і гепарин сефарозу - готували на основі сефарози CL6B (“Pharmacia”, Швеція) згідно з відомими методами (Bickle et al, 1977; Dean et al, 1979).

Специфічність ССЕ визначали за результатами гідролізу ними різних ДНК з відомою первинною структурою (pBR322, pUC19, фагів λ , M-13, ϕ X174).

Одержання компетентних клітин бацил і трансформацію плазмідною ДНК проводили за методом Spizizen (1958).

Плазмідну ДНК із штамів бацил виділяли стандартними методами лужного лізису (Гловер, 1988) та модифікованими нами методами.

Наявність лейкоцитарного α -2 інтерферону людини в культуральному середовищі рекомбінантного штаму *B. subtilis* 3 (105) визначали прямим імуноферментним аналізом із застосуванням комерційного набору “Tween-Test” (Санкт-Петербург), а також за біологічною активністю (гальмуванням цитопатичної дії вірусу везикулярного стоматиту).

Для визначення стабільності плазмідної ДНК у клітинах бацил культури вирощували на поживних середовищах без селективного тиску, а також перевивали через організм лабораторних тварин.

Структурну стабільність плазмід (зокрема збереження гена інтерферону типу α -2) вивчали методом гібридизації (Маниатис и др., 1984).

Електрофорез у поліакриламідному гелі в присутності додецилсульфату натрію проводили за методом Laemmli (1970).

Доклінічне вивчення пробіотиків проводили згідно з РД 42-28-8-89.

При визначенні безпечності бактеріальних культур та пробіотиків на їх основі проводили гістологічне вивчення органів лабораторних та сільськогосподарських тварин.

Специфічність імунних люмінесцентних сироваток вивчали по відношенню до 78 штамів шести видів бацил (*B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. cereus*, *B. pumilus*, *B. coagulans*, *B. macerans*), серед яких були музейні культури, а також штамми, на основі яких розробляються нові біопрепарати.

Макрофаги перитонеального ексудату одержували за описаною методикою (Учитель, 1978). Функціональну активність макрофагів визначали методом люмінолзалежної хемілюмінесценції (Владимиров и др., 1989).

Антивірусні властивості пробіотиків вивчали на моделях експериментальної герпесвірусної і грипоподібної інфекції мишей, генітального герпесу морських свинок (Маренникова и др., 1986) та особливо небезпечної вірусної інфекції, обумовленої вірусом енцефаломієліту коней у морських свинок.

Експериментальну кампілобактеріозну інфекцію відтворювали за розробленою нами методикою (Sorokulova et al., 1997).

Для вивчення транслокації бактерій тваринам вводили перорально по одній дозі біопрепаратів (колібактерину, лактобактерину, біфідумбактерину, біоспорину, субаліну, бактисубтилу) або чисті культури бактерій, які складають основу цих препаратів, у дозі від 10^3 до 10^{10} мікробних клітин.

Взяття крові в мишей для бактеріологічного дослідження проводили з підключичної вени при евтаназії або прижиттєво - з ретроорбітального венозного сплетіння. Проби крові висівали на двофазне середовище (Яковлев, Краснопевцева, 1964) та на відповідне агаризоване середовище.

Гомогенати внутрішніх органів, одержані асептично, висівали на агаризовані поживні середовища. Кількісний підрахунок проводили за Gould (1965) або висівом послідовних десятикратних розведень гомогенатів.

Експериментальні дані обробляли статистично (Ашмарин, Воробьев, 1962).

Розділ 5. СТВОРЕННЯ ТА ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНЕ ВИВЧЕННЯ БІОСПОРИНУ

Виходячи з результатів багаторічного вивчення біології аеробних

спороутворюючих бактерій роду *Bacillus*, а також базуючись на теоретичних передумовах до підбору штамів, перспективних для включення до складу біопрепаратів, відібрали дві культури - *B. subtilis* 3 та *B. licheniformis* 31, - як основу нового пробіотику - біоспорину. Ці культури характеризуються типовими для даних видів фізіолого-біохімічними ознаками, які можуть обумовити ширший діапазон їх дії при сумісному використанні. Так, *B. licheniformis* 31, на відміну від *B. subtilis* 3, характеризується здатністю рости в анаеробних умовах, що є одним з показників різної адаптаційної можливості культур у різних відділах шлунково-кишкового тракту. Відрізняються ці культури також і за іншими властивостями: чутливістю до антимікробних препаратів, спектром антагоністичної активності. Показники специфічної активності *B. subtilis* 3 і *B. licheniformis* 31 щодо *S. sonnei*, *S. flexneri*, *S. typhi*, *S. typhimurium*, *S. aureus*, *C. albicans* статистично достовірно відрізняються

Експериментальними дослідженнями встановлено, що культури в складі препарату мають бути представлені в такому кількісному співвідношенні: *B. subtilis* 3 - $1 \cdot 10^9$ - $8 \cdot 10^9$; *B. licheniformis* 31 - $0,1 \cdot 10^9$ - $2 \cdot 10^9$.

При сполученні цих двох культур у складі біопрепарату сумарна антагоністична активність більш виражена до широкого спектру патогенних та умовно патогенних мікроорганізмів-збудників шлунково-кишкових інфекцій (табл. 1).

Особливої уваги заслуговує визначена висока антагоністична активність біоспорину щодо кампілобактерів, йерсиній, грибів роду *Candida*. Досі невідомі біопрепарати, які характеризуються антагоністичною дією проти цих мікроорганізмів. Важливо також відзначити, що біоспорин не пригнічує мікроорганізмів-представників нормальної мікрофлори.

Вивчення безпечності культур, що входять до складу біоспорину, та лабораторних серій препарату проводили на лабораторних тваринах згідно з РД 42-28-8-89, а також на мавпах макаках-резус.

При вивченні гострої токсичності було встановлено, що введення тваринам культур, які складають основу біоспорину, і введення самого препарату різними способами (також і парентерально) в дозах, що значно перевищують рекомендовані для вживання, у тварин не спостерігається будь-яких патологічних змін, що беззастережно доводять дані гістологічних досліджень. Аналогічні результати безпечності біоспорину виявлено при вивченні хронічної токсичності.

Результати, отримані на лабораторних тваринах, підтверджені да-

ними випробування препарату на приматах - макаках-резус. Введення біоспорину тваринам протягом 10 днів двічі на день не викликало ніяких симптомів порушень в організмі мавп. У нормі залишалися всі клінічні і бактеріологічні показники.

Розділ 6. КЛІНІЧНЕ ВИВЧЕННЯ БІОСПОРИНУ

Реактогенність і безпечність препарату вивчали на добровольцях - здорових людях віком від 25 до 57 років, серед яких було 11 жінок і 10 чоловіків. Всі добровольці знаходилися під систематичним лікарським наглядом не менш як 2 місяці від початку прийому препарату. Були проведені клінічні обстеження, а також бактеріологічні дослідження згідно з програмою випробувань. За весь період спостереження в жодному випадку не помічено показань до дострокового припинення прийому препарату. Всі основні клінічні та бактеріологічні показники залишалися в межах норми. Таким чином, проведені дослідження довели безпечність біоспорину для добровольців.

Державні випробування препарату було проведено у відповідності до затвердженої програми згідно з Наказом Міністерства охорони здоров'я СРСР № 107-У от 20.07.91 г. Головною метою і завданням випробувань було вивчення клінічної ефективності біоспорину як засобу профілактики і лікування дисбактеріозів та гострих шлунково-кишкових інфекцій.

Для державних випробувань біоспорин було представлено у вигляді серій з вмістом в одній дозі $4 \cdot 10^5$ - $2 \cdot 10^6$ та $1 \cdot 10^9$ - $4,5 \cdot 10^9$ живих мікробних клітин. Як препарат порівняння використовували лактобактерин.

Державні випробування біоспорину було проведено в Дніпропетровському науково-дослідному інституті гастроентерології, клінічному відділі Московського науково-дослідного інституту епідеміології і мікробіології ім.Г.Н.Габричевського, Київському інституті удосконалення лікарів для лікування дорослих і дітей з гострими кишковими інфекціями та хронічними захворюваннями органів травлення, ускладнених дисбактеріозами.

При лікуванні гострих кишкових інфекцій за всіма клінічними і особливо за бактеріологічними показниками найкращі результати отримано для біоспорину з високим вмістом живих мікробних клітин в

Таблиця 1

Специфічна активність препарату біоспорин

Тест-культури	Кількість досліджених штамів		Зона за- тримки росту, мм
	всього	з них чутливих	
<i>Bacillus anthracis</i>	2	2	22±8
<i>Campylobacter coli</i>	4	3	17±1
<i>C. jejuni</i>	7	7	19±4
<i>C. laridis</i>	1	0	0
<i>Escherichia coli</i>	18	18	13±4
<i>Enterobacter sp.</i>	2	2	22±8
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1	1	10±2
<i>Klebsiella sp.</i>	9	9	8±3
<i>Proteus mirabilis</i>	4	4	13±4
<i>Proteus vulgaris</i>	8	8	21±4
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	4	0	0
<i>Salmonella abortus-equi</i>	1	1	12±1
<i>S. derby</i>	1	1	16±2
<i>S. greiz</i>	1	1	19±5
<i>S. newport</i>	1	1	11±1
<i>S. stanley</i>	1	1	15±1
<i>S. typhi</i>	1	1	20±2
<i>S. typhimurium</i>	7	7	12±2
<i>Serratia marcescens</i>	6	6	15±5
<i>Shigella flexneri</i>	2	2	23±1
<i>S. sonnei</i>	13	13	21±4
<i>Yersinia enterocolitica</i>	9	9	18±2
<i>Y. pseudotuberculosis</i>	11	11	20±1
<i>Candida albicans</i>	23	19	30±3
<i>C. parapsilosis</i>	4	4	28±2
<i>C. pseudotropicalis</i>	2	2	4±2
<i>C. stellatoidea</i>	9	9	30±4
<i>C. tropicalis</i>	5	4	32±4
<i>Lactobacillus fermentum</i>	6	0	0
<i>L. plantarum</i>	8	0	0
<i>Staphylococcus aureus</i>	25	25	22±5
<i>S. epidermidis</i>	2	2	20±4
<i>Streptococcus faecium</i>	1	1	12±1

одній дозі (табл.2). Аналогічні результати виявлено при лікуванні пацієнтів з хронічними захворюваннями органів травлення, ускладнених дисбактеріозами різного ступеню. Як і при гострих кишкових інфекціях, нормалізація мікрофлори була найефективніша при застосуванні біоспорину з високим вмістом живих мікробних клітин (табл.3).

Підсумовуючи дані, отримані в різних клінічних закладах, можна зробити висновок, що на всіх вивчених контингентах хворих відзначено безпечність біоспорину, його високу клінічну ефективність. Найкращі клінічні та бактеріологічні показники встановлено при застосуванні біоспорину з високим вмістом живих мікробних клітин. Так, відзначено повну елімінацію сальмонел і шигел у всіх хворих, значно знижувалася кількість або повністю елімінувалися умовно патогенні ентеробактерії, включаючи патогенну кишкову паличку (у 73,9 і 64% хворих відповідно), патогенні стафілококи (у 75% хворих) і гриби роду *Candida* (у 75% хворих). Клінічний ефект при застосуванні біоспорину з низьким вмістом живих мікробних клітин не відрізнявся від впливу лактобактерину і був менш виражений.

Важливим результатом проведених клінічних випробувань є дані про ефективність кількісного вмісту живих мікробних клітин в одній дозі препарату. Встановлено, що найоптимальніша разова доза є $1 \cdot 10^9$ - $1 \cdot 10^{10}$ живих мікробних клітин. Результати клінічних випробувань підтвердили дані, отримані *in vitro*, які також обґрунтовують ці кількісні характеристики біоспорину.

Розділ 7. ПОРІВНЯЛЬНЕ ВИВЧЕННЯ БІОСПОРИНУ ТА ІНШИХ КОМЕРЦІЙНИХ ПРЕПАРАТІВ НА ОСНОВІ БАЦИЛ

У медичній практиці різних країн застосовують препарати на основі бактерій роду *Bacillus*. Так, широкого розповсюдження в країнах Західної Європи набув пробіотик бактисубтил виробництва фірми "Galenika" (Югославія) і французької фірми "Marion Merrell" (Tihole, 1982). В основі цього препарату - штам *B. cereus* IP 5832 з колекції Інституту Пастера (Париж). Відомий також біопрепарат цереобіоген ("Xing Jian", Китай), дія якого обумовлена штамом *B. cereus* DM-423 (Wei, Kan, 1981). Основою ентерогерміну ("Sanofi Winthrop", Італія) є культура *B. subtilis* (Coppi, 1985).

Проводили порівняльне вивчення розробленого пробіотика біоспорину та відомих комерційних біопрепаратів. Однією з найважливіших характеристик пробіотиків є їх безпечність та специфічна активність. При вивченні специфічної активності особливої уваги приділя

ли дії цих біопрепаратів на тест-культури, резистентні до антибіотиків, а також на ті види умовно патогенних мікроорганізмів, щодо яких інші відомі пробіотики не ефективні.

Отримані дані свідчать про те, що серед пробіотиків з бацил тільки біоспорин характеризується високою антагоністичною активністю щодо клінічних ізолятів кандид, стафілококів, кампілобактерій, йерсіній, ентеропатогенних *Escherichia*, в тому числі і резистентних до антибіотиків (табл. 4). Так, штам *E. coli* 683, стійкий одночасно до семи антибіотиків, чутливий до дії біоспорину (діаметр зони затримки росту - 24 ± 2 мм), в той же час інші пробіотики з бацил його не пригнічують. Штами *Campylobacter*, які характеризуються високою резистентністю до багатьох антибіотиків, були чутливими до біоспорину. Інші перевірені біопрепарати не виявили антагоністичної дії на ці культури.

Таким чином, одержані дані свідчать про те, що розроблений пробіотик біоспорин суттєво відрізняється специфічною активністю від відомих комерційних препаратів з бацил.

Проводили також порівняльне вивчення гострої токсичності пробіотиків з бацил як одного з показників їх безпечності. Встановлено, що LD_{50} для біоспорину при внутрішньочеревному введенні перевищує 10^{10} КУО. Для бактисубтилу і цереобіогену ці показники складають відповідно $5 \cdot 10^8$ і $1 \cdot 10^9$ (табл.4). Проведені гістологічні дослідження внутрішніх органів мишей, які одержували бактисубтил в дозах, рекомендованих для застосування людям, свідчили про перенесені шоківі реакції: нерівномірну повнокровність внутрішніх органів,

емфізему легенів, різку повнокровність печінки, крововиливи в селезінці, ішемію кори нирок, дистрофію міокарда, гепатоцитів, нервових клітин кори головного мозку. Дані, одержані для біоспорину, свідчать про те, що введення препарату тваринам навіть у дозах, які значно перевищують рекомендовані для застосування, не викликає в них будь-яких патологічних змін, що доведено як при макроскопічному вивченні, так і при гістологічних дослідженнях.

Необхідно підкреслити, що в основі бактисубтилу і цереобіогену - штами *B.cereus*. Серед бактерій роду *Bacillus* це єдиний вид, який віднесено до умовно патогенних, оскільки часто він є етіологічним фактором харчових токикоінфекцій через продукцію токсичних метаболітів.

Таким чином, за основними показниками біоспорин перевершує відомі пробіотики, які базуються на бактеріях роду *Bacillus*.

ПОРІВНЯЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА ПРОБІОТИКІВ З БАЦИЛ

Біопрепарат	Основа препарату	Гостра токсичність, LD ₅₀
Біоспорин	<i>B. subtilis</i> 3 <i>B. licheniformis</i> 31	$> 10^{10}$ КУО
Бактисубтил	<i>B. cereus</i> IP 5832	$5 \cdot 10^8$ КУО
Цереобіоген	<i>B. cereus</i> DM-423	$1 \cdot 10^9$ КУО

Специфічна активність пробіотиків з бацил

Тест-культури	Кількість дослід-жених штамів	Кількість штамів, чутливих до пробіотиків			
		Біоспо-рин	Бакти-субти л	Цереобі-оге н	Ентерогер-мін
<i>Campylobacter coli</i>	4	3	0	0	0
<i>C. jejuni</i>	7	7	0	0	0
<i>Candida albicans</i>	23	19	0	0	0
<i>C. parapsilosis</i>	4	4	0	0	0
<i>C. pseudotropicalis</i>	2	2	0	0	0
<i>C. stellatoidea</i>	9	9	0	0	0
<i>C. tropicalis</i>	5	4	0	0	0
<i>Staphylococcus aureus</i>	22	22	0	0	0
<i>Yersinia enterocolitica</i>	9	9	0	0	0
<i>Y. pseudotuberculosis</i>	11	11	0	0	0

Розділ 8. ТЕХНОЛОГІЧНІ ПРИНЦИПИ ВИГОТОВЛЕННЯ БІОСПОРИНУ ТА РОЗРОБКА МЕТОДІВ КОНТРОЛЮ ПРЕПАРАТУ

Розроблені дві технології виробництва біоспорину: одна з них - методом поверхневого вирощування бактеріальних культур на агаризованих поживних середовищах, а інша - з використанням глибинного культивування. Технологічна схема однакова для обох методів, оскільки включає такі основні стадії: одержання маточних культур; одержання нативної біомаси; приготування препарату; ліофілізація препарату; контроль готового препарату згідно з фармакопейною статтею; пакування та маркування препарату.

Біоспорин виробляється ВАТ “Дніпрофарм” методом поверхневого культивування і Центром військово-технічних проблем біологічного захисту НДІ мікробіології МО РФ - глибинним культивуванням.

Біоспорин, одержаний різними методами, не відрізняється як за основними показниками якості згідно з фармакопейною статтею на препарат, так і за клінічною ефективністю.

Порівняльні клінічні випробування лікувальної і профілактичної ефективності біоспорину, виготовленого двома методами, проведено згідно з затвердженою програмою. Одержані результати підтвердили ідентичність біоспорину, одержаного різними методами, за характером і ступенем вираженості лікувального та профілактичного ефекту.

Важливим показником у процесі виробництва і при контролі біопрепарату є перевірка справжності штамів, які входять до його складу. Тому для забезпечення надійного та швидкого контролю справжності виробничих штамів необхідно було розробити методи експрес-діагностики *B. subtilis* 3 і *B. licheniformis* 31.

Нами разом із співробітниками НВО “Биотехнология” (м. Москва) отримано діагностичні сироватки для імунофлуоресцентного аналізу виробничих культур. Специфічність сироваток перевірено по відношенню до культур аеробних спороутворюючих бактерій із колекції Інституту мікробіології і вірусології НАН України. Вивчали музейні культури різних видів, а також штами, на основі яких розробляються нові біопрепарати. Всього було вивчено 78 штамів шести видів бацил (*B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. cereus*, *B. pumilus*, *B. coagulans*, *B. macerans*). У досліджених розведеннях (1:8 для сироватки до *B. subtilis* 3 і 1:4 - для сироватки до *B. licheniformis* 31) не виявлено перехресних взаємодій цих сироваток з гетерологічними культурами. Специфічні реакції спостерігали тільки з відповідними гомологічними культурами.

Таким чином, одержані діагностичні сироватки до штамів *B. subtilis* 3 і *B. licheniformis* 31, які забезпечують надійну експрес-діагностику справжності виробничих культур на всіх технологічних етапах виробництва біоспорину.

Розділ 9. СТВОРЕННЯ ПРИНЦИПОВО НОВИХ ВИСОКОЕФЕКТИВНИХ РЕКОМБІНАНТНИХ ПРОБІОТИКІВ НА ОСНОВІ БАЦИЛ

Біоспорин, як і всі інші відомі пробіотики, не має вираженої антивірусної дії. У той же час відомо, що в структурі захворювань людини і тварин значну частину складають інфекції вірусної та вірусно-бактеріальної етіології. Тому розробка вискоефективних препаратів з антибактеріальними та антивірусними властивостями є актуальною проблемою.

Найперспективнішими для створення таких препаратів є аеробні спороутворюючі бактерії, тому що вони характеризуються вираженою антагоністичною активністю щодо широкого спектру патогенних та умовно патогенних мікроорганізмів. Відомо також, що бацили - зручна і добре вивчена система для клонування чужорідних про- та еукаріотичних генів; отже на їх основі можна конструювати штами з заданими властивостями.

Створення рекомбінантних пробіотиків обговорюється в літературі як одне з важливих напрямків досліджень (Goldin, 1992; Tannock, 1992; Havenaar, 1992; Шендеров, 1997), але досі такі пробіотики не розроблені.

Виходячи з цих посилань, було поставлено завдання сконструювати методами генетичної інженерії на основі бацил з високою антагоністичною активністю щодо патогенних та умовно патогенних мікроорганізмів нові штами, які поряд з цими важливими

властивостями мали проявляти антивірусну активність завдяки введенню генетичної інформації, що кодує продукцію універсальної антивірусної сполуки - інтерферону.

Однією з важливих умов забезпечення успішної трансформації бацил чужорідною ДНК є відсутність у реципієнта системи рестрикції-модифікації (Щелкунов, 1986). Тому першим етапом при відборі перспективних культур для клонування ДНК було вивчення рестриктазної активності бацил.

Для проведення досліджень було відібрано 183 культури аеробних спороутворюючих бактерій із колекції Інституту мікробіології і вірусології НАН України, серед них музейні культури, а також ізолювані з ґрунту, ризосфери рослин, організму людини, сільськогосподарських та лабораторних тварин. Сайт-специфічні ендонуклеази (ССЕ) було виявлено у 76 штаммах. Специфічність знайдених ферментів вдалося визначити для більшості культур, але для деяких наявність ендонуклеаз було тільки показано. Всього виявлено рестриктази шести різних специфічностей (табл. 5).

Таблиця 5

Субстратна специфічність виявлених ендонуклеаз

Назва рестриктази	Послідовність нуклеотидів, що впізнається	Прототип
Bce751I	G↑GATCC	BamHI
Bli 86I	AT↑CGAT	ClaI
Bli17I	GGTCTC(N)↑1/5	PpaI
Bsu22I	T↑CCGGA	BspMI
Bsu687I	CTGCA↑G	PstI
Bsu53Д2I	G↑GNCC	Sau96I

Аналіз точок розщеплення різних ДНК з відомою первинною структурою доводить, що вивчені ферменти є істинними ізошизомерами відомих рестриктаз.

Відмічено залежність частоти виявлення бактерій-продуцентів від еконіші їх виділення. Найбільшу кількість штамів, які синтезують ССЕ, знайдено серед культур, ізолюваних з ґрунту, найменшу - серед культур з організму людини і тварин. Але останні характеризуються найрізноманітнішим спектром штамів-продуцентів ССЕ - серед них відібрані культури, які продукують ферменти чотирьох специфічностей (рис. 1).

Отримані дані свідчать про те, що більш як 36 % досліджених культур бацил характеризувалися рестриктазною активністю. Тому очевидно, що при відборі штамів бацил як реципієнтів ДНК при генно-інженерних дослідженнях, необхідно вивчати наявність у них ендонуклеаз рестрикції.

На основі отриманих результатів для подальшої роботи відібрали декілька штамів - *B. subtilis* 3 (основа біоспорину); штами *B. subtilis* 2895 і 2896, які характеризуються високою антагоністичною активністю, а також лабораторні штами *B. subtilis* BD 170 та BD 224, які використовуються в генно-інженерних експериментах.

Трансформацію відібраних бактеріальних культур проводили плазмідами серії рВМВ, які кодують синтез секреторного (рВМВ 105) та внутрішньоклітинного (рВМВ 104) інтерферону (дослідження проводилися спільно з ДНЦ ВБ "Вектор", м.Новосибірськ). Плазміди

pBMB містять ген інтерферону у вигляді хімічно синтезованого аналога гена людського лейкоцитарного α -2 інтерферону. У структурі плазмиди pBMB 105 ген інтерферону стикований з “геном” сигнального пептиду, гомологічного послідовності гена α -амілази, який забезпечує ефективну секрецію з клітини гетерологічного білка. Плазміда pBMB 104 не має в структурі такої послідовності нуклеотидів перед геном інтерферону, тому продукований білок залишається всередині клітини.

При вивченні стабільності плазмід в різних штаммах бацил встановлено, що найбільшою стабільністю відрізняється плазміда pBMB 105 в штамі *V.subtilis* 3. Навіть через 10 пасажів на середовищі без селективного тиску спостерігалось її 100 %-не збереження. Тому подальші дослідження проводили з рекомбінантним штамом *V.subtilis* 3 (105).

Рестрикційним аналізом, а також методом гібридизації з фрагментом плазмиди, який містить ген інтерферону, показано структурну цілісність плазмиди після пасування культури на поживних середовищах без селективного тиску і через організм лабораторних тварин.

При вивченні біологічних властивостей сконструйованого штаму особливу увагу приділяли дослідженню продукції α -2 інтерферону. Для цього перш за все аналізували склад білків культурального середовища після росту *V.subtilis* 3(pBMB 105), вдавшись до електрофорезу в поліакриламідному гелі. В культуральному середовищі рекомбінантного штаму виявлено додатковий білок, подібний за своєю електрофоретичною рухливістю до α -2 інтерферону. Біологічним тестуванням, а також імуноферментним аналізом підтверджено наявність інтерферону в культуральному середовищі після росту *V.subtilis* 3(pBMB 105) і встановлено, що культура продукує інтерферон в кількості 10^4 - 10^5 МО/мл культурального середовища. Поряд з цією новою для штаму властивістю він зберіг високу антагоністичну активність материнської культури щодо патогенних та умовно патогенних мікроорганізмів.

У дослідах, проведених *in vitro* та на лабораторних тваринах, доведено, що введена плазмідна ДНК не передається від *V.subtilis* 3(105) іншим мікроорганізмам - як представникам нормальної мікрофлори, так і умовно патогенним та патогенним культурам.

Рекомбінантний штам *V.subtilis* 3(105) став основою нового пробіотика - субаліну.

Проведені всебічні випробування безпечності (включаючи гістологічне вивчення різних органів і тканин) препарату субаліну та культури, яка входить до його складу, на лабораторних та сільськогосподарських тваринах довели, що при різних способах введення (в тому числі і парентерально) в дозах, які значно перевищують рекомендовані до застосування, ні культура, ні препарат не викликають у тварин будь-яких патологічних змін.

Розділ 10. ЕФЕКТИВНІСТЬ БІОСПОРИНУ І СУБАЛІНУ ПРИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИХ БАКТЕРІАЛЬНИХ І ВІРУСНИХ ІНФЕКЦІЯХ

Специфічну активність пробіотиків вивчали при різних експериментальних інфекціях на лабораторних тваринах.

Результати проведених досліджень свідчать про те, що навіть одноразове профілактичне введення біоспорину і субаліну, спричиняє високий протективний ефект при кампілобактеріозній інфекції. Рівень захисту при LD₅₀ складає 90-100 % (рис.2), а при LD₁₀₀ - 80 % (рис. 3). При цьому не помічена різниця в ефективності пробіотиків.

Висока антагоністична активність біоспорину і субаліну щодо штамів кампілобактерій, зареєстрована *in vitro*, корелює з їх активністю в дослідях на тваринах. Для біоспорину такий взаємозв'язок продемонстровано щодо інших умовно патогенних мікроорганізмів (сальмонел, шигел, кандид, стафілококів, клебсієл, протеїв та ін.) при порівняльному аналізі результатів клінічних випробувань і антагоністичної активності препарату *in vitro*.

Суттєву різницю між пробіотиками виявлено при експериментальних вірусних інфекціях.

Встановлено, що індекс ефективності субаліну навіть при одноразовому пероральному введенні за добу до зараження вірусом грипу складає 73, в той час як для біоспорину - 27 (рис. 4).

При багаторазовому введенні препаратів (за 12 годин до інфікування, а потім ще двічі з інтервалом у 12 годин) захисний ефект субаліну був також вищим. При збільшенні дози вірусу для зараження різниця в протективних властивостях препаратів збільшувалася. Так, при інфікуванні вірусом грипу в дозі $10LD_{50}$ індекс ефективності становив 70 для субаліну і 40 для біоспорину, а при $100LD_{50}$ - 50 і менше за 10, відповідно (рис. 5).

Аналогічні результати отримано при експериментальній герпесвірусній інфекції. Застосування препаратів одноразово обумовило індекс ефективності для субаліну 65, для біоспорину - 33. При триразовому введенні препаратів різниця в ефективності пробіотиків була тим вищою, чим більша доза вірусу використовувалася для зараження тварин.

Високу антивірусну активність субаліну показано на моделі генітального герпесу у морських свинок при місцевому та ректальному застосуванні. Було встановлено, що субалін не поступається своєю антивірусною дією комерційному препаратові ридостину.

При особливонебезпечній інфекції, обумовленій вірусом енцефаломієліту коней, тільки субалін виявився ефективним засобом захисту тварин. Показники захисту становили 30%, що відповідає помірному захисту, який спостерігається при парентеральному введенні рекомбінантного α -2 інтерферону - реаферону.

Розділ 11. ДЕЯКІ МЕХАНІЗМИ БІОЛОГІЧНОЇ ДІЇ ПРЕПАРАТІВ З БАЦИЛ НА МАКРООРГАНІЗМ

Встановлено, що при пероральному введенні пробіотиків або чистих культур, які входять до їх складу, частина життєздатних бактерій (приблизно 0,1%) в перші хвилини проникає в кров і органи лабораторних тварин, не викликаючи при цьому ніяких патологічних процесів. У подальшому бактерії швидко елімінуються як з крові, так і з внутрішніх органів.

Відзначені факти давали підставу припускати, що транслокація перорально введених мікроорганізмів є одним з механізмів дії біопрепаратів, який суттєво посилює захисні реакції макроорганізму.

Тому наступним етапом роботи було вивчення впливу пробіотиків на деякі показники імунної резистентності організму.

Виявлено, що як внутрішньочеревне, так і пероральне введення біоспорину і субаліну стимулює функціональну активність макрофагів перитонеального ексудату. Особливий інтерес викликали дані про зміну функціональної активності макрофагів при пероральному застосуванні пробіотиків. Показано, що при одноразовому пероральному введенні цих пробіотиків спостерігається поступова активація макрофагів з максимумом через 4 години (рис. 6). Як і при внутрішньочеревному введенні, рівень стимуляції макрофагів залежить від кількості перорально введених мікробних клітин; найвищі значення індексу стимуляції зареєстровано при застосуванні пробіотиків у дозі 10^9 мікробних клітин.

Виходячи з отриманих даних про стимуляцію біоспорином і субаліном функціональної активності макрофагів, вважали, що доцільно вивчити вплив цих пробіотиків на інші показники неспецифічної резистентності макроорганізму, зокрема, на індукцію ендogenous інтерферону.

Проведені дослідження на лабораторних тваринах показали, що пробіотики з бацил є ефективними індукторами інтерферону. Рівень індукції відрізняється в різних органах (від $2 \cdot 10^2$ до $6,4 \cdot 10^3$ МО/мл):

найвищі значення рееструються в тимусі, лімфатичних вузлах, селезінці. Суттєва різниця між біоспорином і субаліном відзначена за здатністю індукувати ендogenous інтерферон в кишечнику. Так, через 4 години після одноразового перорального введення субаліну рівень інтерферону в кишечнику становив $1,6 \cdot 10^3$ МО/мл і зберігався до 24 годин. При введенні біоспорину індукції інтерферону в кишечнику не відбувається.

Оскільки штам, що входить до складу субаліну, характеризується здатністю продукувати α -2 інтерферон людини, необхідно було встановити, чи продукується інтерферон в організмі при пероральному введенні пробіотика. Для цього гомогенати внутрішніх органів мишей, яким вводили субалін, перевіряли на наявність α -2 інтерферону людини. Інтерферон α -2 людини виявлено у всіх тестованих органах. Найбільшу кількість його зареєстровано в печінці ($3,2 \cdot 10^3$ - $6,4 \cdot 10^3$ МО/мл), легенях ($8,0 \cdot 10^2$ - $1,6 \cdot 10^3$ МО/мл) і кишечнику ($8,0 \cdot 10^2$ - $3,2 \cdot 10^3$ МО/мл).

Таким чином, проведені дослідження довели, що пробіотики з бацил є ефективними індукторами ендogenous інтерферону. Субалін при пероральному застосуванні продукує в різних органах α -2 інтерферон людини. Можливо, захисний ефект біоспорину при вірусних інфекціях пов'язаний з індукцією ендogenous інтерферону, оскільки виявлена кількість інтерферону достатня для протівірусного захисту.

Вивчали вплив розроблених нами пробіотиків на специфічну імунну відповідь при вакцинації. Встановлено, що навіть одноразове пероральне введення біоспорину і субаліну тваринам перед вікцинацією обумовлює більш тривалий і високий рівень специфічної імунної відповіді до дифтерійного та правцевого компонентів АКДП-вакцини.

Аналогічні результати отримано при використанні інших вакцин. Так, імунізація вакциною з клінічного штаму *Candida albicans* 335 була ефективнішою при одночасному пероральному введенні пробіотиків з бацил (рис. 7).

Таким чином, теоретично обґрунтовані і практично реалізовані підходи до створення на основі бактерій роду *Bacillus* біопрепаратів з унікальними властивостями. Одержані дані про можливість конструювання методами генетичної інженерії рекомбінантних штамів з запланованими властивостями відкривають нові напрямки розробки біопрепаратів і вивчення механізмів взаємодії макро- і мікроорганізмів.

ВИСНОВКИ

1. Аеробні спороутворюючі бактерії роду *Bacillus* є невід'ємним компонентом екзогенної мікрофлори теплокровних. Серед інших представників екзогенної мікрофлори бацили характеризуються перевагами, які дозволяють вважати їх найбільш ефективними для створення нових пробіотиків.
2. На основі вивчення біологічних особливостей аеробних спороутворюючих бактерій розроблено принципово новий високоефективний пробіотик біоспорин (патент України № 689 і патент Російської Федерації № 1722502). До складу препарату включено дві культури бацил, які доповнюють одна одну за фізіолого-біохімічними властивостями та специфічною активністю.
3. Розроблені наукові принципи конструювання рекомбінантних бацил з запланованими властивостями, на базі яких створено біопрепарат субалін, що не має аналогів у світовій практиці (патенти Російської Федерації № 1839459, 2035185).
4. Біоспорин характеризується унікальним спектром антагоністичної активності щодо патогенних та умовно патогенних мікроорганізмів і не впливає негативно на представників нормальної мікрофлори. На відміну від відомих пробіотиків, біоспорин пригнічує розвиток кандид, йерсиній, кампілобактерій.
5. Державні клінічні випробування біоспорину показали його високу профілактичну і лікувальну ефективність при гострих кишкових інфекціях, а також для корекції мікрофлори при дисбактеріозах різної етіології.
6. Біоспорин перевершує відомі зарубіжні комерційні препарати з бацил за основними показниками безпечності та специфічної активності. З усіх вивчених пробіотиків, основаних на бацилах, тільки біоспорин характеризується антагоністичною активністю щодо патогенних та умовно патогенних мікроорганізмів, в тому числі і полірезистентних до антибіотиків.
7. Субалін поряд з високою антимікробною активністю до широкого спектра патогенних та умовно патогенних мікроорганізмів характеризується антивірусними властивостями за рахунок синтезу інтерферону людини α -2 типу. Індекс ефективності при одноразовому пероральному введенні субаліну становить 73 при грипозній інфекції і 65 - при експериментальній герпесвірусній інфекції. При багаторазових введеннях субаліну ефективність захисту залежить від дози введеного вірусу.
8. Продемонстровано ефективність біоспорину і субаліну при експериментальній кампілобактеріозній інфекції. Рівень захисту однаковий для обох препаратів і при LD_{50} становить 90-100 %, а при LD_{100} - 80 %.
9. Вперше встановлено, що при пероральному введенні пробіотиків або культур, які складають їх основу, частина життєздатних бактерій (біля 0,1%) в перші хвилини проникає в кров і органи теплокровних, не викликаючи при цьому ніяких патологічних процесів. Показано, що транслокація бактерій-пробіотиків є одним з факторів стимуляції імунної резистентності макроорганізму.
10. Біоспорин і субалін при пероральному введенні значно підвищують неспецифічну імунну резистентність макроорганізму, а також специфічну імунну відповідь при застосуванні їх під час вакцинації.
11. Розроблено та затверджено в установленому порядку необхідну нормативну документацію для застосування біоспорину в медицині, а субаліну - в ветеринарній практиці.

СПИСОК РОБІТ, ЩО ОПУБЛІКОВАНІ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Смирнов В.В., Резник С.Р., Сорокулова И.Б. Методические рекомендации по выделению и идентификации бактерий рода *Bacillus* из организма человека и животных - Киев. - 1983. - 50 с.

2. Сорокулова И.Б. Перспективы применения бактерий рода *Bacillus* для конструирования новых биопрепаратов. // Антибиотики и химиотерапия. - 1996. - 41, № 10. - С. 13-15.
3. Сорокулова И.Б. Сравнительное изучение биологических свойств биоспорина и других коммерческих препаратов на основе бацилл // Микробиол. журн. - 1997. - 59, № 6. - С. 43-49.
4. Сорокулова И.Б. Изучение безопасности и реактогенности нового пробиотика субалина для добровольцев // Микробиол. журн. - 1998. - 60, № 1. - С. 43-46.
5. Сорокулова И.Б. Влияние пробиотиков из бацилл на функциональную активность макрофагов // Антибиотики и химиотерапия. - 1998. - 43, № 2. - С. 20-23.
6. Smirnov V.V., Sorokulova I.B., Reznik S.R. Aerobic spore-forming bacteria as aetiological factors of bacteraemia// Journal of Hygiene, Epidemiology, Microbiology and Immunology. - 1984.- № 2. - P.185-191.
7. Смирнов В.В., Сорокулова И.Б., Резник С.Р. Спорообразующие аэробные бактерии как этиологический фактор бактериемий // Журнал гигиены, эпидемиологии, микробиологии и иммунологии. - 1984. - № 2. - С.205-212.
8. Смирнов В.В., Резник С.Р., Сорокулова И.Б., Вьюницкая В.А. О некоторых механизмах возникновения бессимптомной бактериемии // Микробиол. журн. - 1988. - 50, № 5 - С. 56-59.
9. Крамаров В.М., Скрыпина Н.А., Смолянинов В.В., Смирнов В.В., Резник С.Р., Сорокулова И.Б., Матвиенко Н.И. Новые продуценты сайтспецифических эндонуклеаз из микроорганизмов рода *Bacillus* // Молекулярная генетика, микробиология, вирусология. - 1989. - № 6. - С. 42-45.
- 10.Сорокулова И.Б., Крамаров В.М., Резник С.Р., Смирнов В.В. Сайт-специфические эндонуклеазы бактерий рода *Bacillus* // Микробиол. журн. - 1990. - 52, № 5. - С. 8-11.
- 11.Смирнов В.В., Резник С.Р., Сорокулова И.Б., Вьюницкая В.А. Дискуссионные вопросы создания и применения бактериальных препаратов для коррекции микрофлоры теплокровных // Микробиол. журн. - 1992. - 54, № 6. - С. 82-94.
- 12.Смирнов В.В., Резник С.Р., Вьюницкая В.А., Сорокулова И.Б., Самгородская Н.В., Тофан А.В. Современные представления о механизмах лечебно-профилактического действия пробиотиков из бактерий рода *Bacillus* // Микробиол. журн. - 1993. - 55, №4. - С. 92-112.
- 13.Смирнов В.В., Руденко А.В., Самгородская Н.В., Сорокулова И.Б., Резник С.Р., Сергейчук Т.М. Чувствительность к антимикробным препаратам штаммов бацилл, составляющих основу некоторых пробиотиков // Антибиотики и химиотерапия. - 1994. - 39, № 4. - С. 23-28.
- 14.Смирнов В.В., Резник С.Р., Сорокулова И.Б. Високоэффективний біологічний препарат біоспорин // Лікарська справа. - 1994. - № 5-6. - С. 133-138.
- 15.Belyavskaya V.A., Sorokulova I.B., Pyichev A.A. Prospective for constructing immune preparation based on recombinant bacilli // Intern. J. Immunorehabilitation. -1994.- №1, Suppl. - P. 56.
- 16.Чудновская Н.В., Рыбалко С.Л., Сорокулова И.Б., Белявская В.А., Резник С.Р., Смирнов В.В. Антивирусная активность пробиотиков из бацилл // Доповіді Національної академії наук України. - 1995. - № 2. - С. 124-126.
- 17.Смирнов В.В., Резник С.Р., Вьюницкая В.А., Сорокулова И.Б., Литвин В.П. Влияние комплексного пробиотика споролакта на микробиоценоз кишечника теплокровных// Микробиол. журн. - 1995. - 57, № 4. - С. 42-49.
- 18.Грачева Н.М., Гаврилов А.Ф., Соловьева А.И., Смирнов В.В., Сорокулова И.Б., Резник С.Р., Чудновская Н.В. Эффективность нового бактериального препарата биоспорина при лечении острых кишечных инфекций // Журн. микробиол. - 1996. - № 1. - С. 75-77.
- 19.Сорокулова И.Б., Белявская В.А., Масычева В.И., Смирнов В.В. Рекомбинантные пробиотики: проблемы и перспективы использования в медицине и ветеринарии// Вестник Российской Академии медицинских наук. - 1997. - № 3. - 46-49.
- 20.Sorokulova I.B., Kirik D.L., Pinchuk I.V. Probiotics against *Campylobacter* pathogens// J. Travel Med. - 1997. - № 4. - P. 167-170.

21. Осипова И.Г., Сорокулова И.Б., Терешкина Н.В., Григорьева Е.В. Изучение безопасности бактерий рода *Bacillus*, составляющих основу некоторых пробиотиков // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. - 1998. - № 6. - С.68-70.
22. А.с. 1398868 СССР, МКИ⁴ А 61 К 35/74. Способ лечения гнойно-септических послеродовых заболеваний / Смирнов В.В., Резник С.Р., Сорокулова И.Б., Вьюницкая В.А., Афонская С.В., Голота В.Я., Афиногенова Е.Н., Голота Л.Г., Иванюта С.О., Грохольский В.А. (СССР). - № 3902829/28-14; Заявлено 03.06.85; Опублик. 30.05.88, Бюл. № 20. - 2 с.
23. А.с. 1645299 СССР, МКИ⁵ С 12 N 9/22, 1/20. Штамм бактерий *Bacillus cereus* - продуцент эндонуклеазы Все 751 1/ Смирнов В.В., Резник С.Р., Сорокулова И.Б., Крамаров В.М., Смолянинов В.В., Матвиенко Н.И. (СССР). - № 4495837/13; Заявлено 20.10.88; Опублик. 30.04.91, Бюл. № 16. - 2 с.
24. А.с. 1659479 СССР, МКИ⁵ С 12 N 9/14, 1/20. Штамм бактерий *Bacillus licheniformis* - продуцент рестриктазы Вli 49 1/ Крамаров В.М., Смолянинов В.В., Матвиенко Н.И., Смирнов В.В., Резник С.Р., Сорокулова И.Б. (СССР). - № 4499064/13; Заявлено 27.10.88; Опублик. 30.06.91, Бюл. № 24. - 2 с.
25. Пат. 689 Украина, МКИ⁵ А 61 К 39/02, 35/74. Препарат биоспорин для профилактики та лікування шлунково-кишкових захворювань людини / Смирнов В.В., Резник С.Р., Сорокулова И.Б., В'юницька В.О., Слабоспицька А.Т., Берилло Е.А., Скорикова І.Г., Чаплинський В.Я., Тофан А.В. (Україна). - № 4641513/13; Заявл. 06.02.89; Опубл.
26. Пат. 8443 Украина, МКИ А 61 К 35/74. Спосіб лікування гнійно-септичних післяродових захворювань / Смірнов В.В., Резник С.Р., Сорокулова І.Б., В'юницька В.О., Афонська С.В., Голота В.Я., Афіногенова К.М., Голота Л.Г., Иванюта С.О., Грохольський В.А. (Україна). - АІ 13968868; Заявл. 03.06.85; Опубл. 30.09.96, Бюл. № 3.-2с.
27. Пат. 1722502 Российская Федерация, МКИ⁵ А 61 К 39/02, 35/74. Препарат биоспорин для профилактики и лечения желудочно-кишечных заболеваний человека / Смирнов В.В., Резник С.Р., Сорокулова И.Б., Вьюницкая В.А., Слабоспицкая А.Т., Берилло Э.А., Скорикова И.Г., Чаплинский В.Я., Тофан А.В. (Украина) - № 4641513/13; Заявл. 06.02.89; Опубл. 30.03.92, Бюл. № 12. - 7 с.
28. Пат. 1839459 Российская Федерация, МКИ⁵ С 12 N 1/21. Штамм бактерий *Bacillus subtilis*, обладающий антивирусной и антибактериальной активностью / Смирнов В.В., Белявская В.А., Ильичев А.А., Петренко В.А., Тимофеев И.В., Нестеров А.Е., Резник С.Р., Сорокулова И.Б. - № 4836055/13 ; Заявл. 07.06.90; Опублик. 23.06.94. - 4 с.
29. Пат. 2035185 Российская Федерация, МКИ⁶ А 61 К 35/66. Профилактический биопрепарат субалин / Смирнов В.В., Резник С.Р., Сорокулова И.Б., Сандахчиев Л.С., Петренко В.А., Ильичев А.А., Белявская В.А., Тимофеев И.В. - № 5025233/13; Заявл. 31.01.92; Опублик. 20.05.95, Бюл. № 14. - 5с.
30. Пат. 2035186 Российская Федерация, МКИ⁶ А 61 К 35/66. Профилактический биопрепарат споролакт/ Резник С.Р., Сорокулова И.Б., Вьюницкая В.А., Литвин В.П., Смирнов В.В. (Украина) - № 5054722/13; Заявл. 09.07.92; Опублик. 20.05.95, Бюл. № 14. - 2 с.
31. Смирнов В.В., Сорокулова И.Б., Осипова И.Г., Созаева Л.Г., Саркисов С.Э. Способ коррекции микрофлоры вагины/ Положительное решение о выдаче патента по заявке № 96122712/13 от 27.11.96 г.
32. Смирнов В.В., Сорокулова И.Б., Осипова И.Г. Биопрепарат - субтикол для профилактики и лечения инфекционных болезней / Положительное решение о выдаче патента по заявке № 98101454/13 от 04.02.98 г.
33. Поберий И.А., Харечко А.Т., Кузнецов В.В., Филин В.А., Доронин А.Н., Смирнов В.В., Сорокулова И.Б. Способ получения эубиотика биоспорина// Приоритетная справка по заявке № 96123690
34. Smirnov V.V., Kramarov V.M., Sorokulova I.B., Reznik S.R., Matvienko N.I. Biosynthesis of site-specific endonucleases by bacteria of the genus *Bacillus* // "The Industrial Applications of Enzymes". - Pisa. - 1990. - P. 14.

35. Smirnov V.V., Sorokulova I.B., Belyavskaya V.A., Reznik S.R., Illichev A.A., Petrenko V.A. Perspectives for use of *Bacillus subtilis* recombinant strains in biopreparations. // 6-th International Symposium on Genetics of Industrial Microorganisms. GIM 90. - Strasbourg. - 1990. - P.21.
36. Smirnov V.V., Kramarov V.M., Sorokulova I.B., Reznik S.R., Matvienko N.I. Bacilli as producers of site-specific endonucleases. // 6-th International Symposium on Genetics of Industrial Microorganisms. GIM 90. - Strasbourg. - 1990. - P.37.
37. Sorokulova I.B. Translocation of exogenous microflora through mucous membranes of warm-blooded. // IUMS Congress: Bacteriology & Mycology. - Osaka. - 1990. - P.149.
38. Самгородская Н.В., Сорокулова И.Б., Ралко Н.М. Изучение действия некоторых биопрепаратов на бактерии рода *Yersinia* // Микробиол. журн. - 1994. - 56, № 4. - С. 81-82.
39. Белявская В.А., Масычева В.И., Сорокулова И.Б., Ильичев А.А. Рекомбинантные пробиотики: проблемы безопасности // Междунар. конф, посвящ. памяти академика А.А.Баева. - Москва. - 1996. - С.143.
40. Sorokulova I.B., Smirnov V.V. New approach to the treatment for enteric infections // 7-th Intern. Congress Inf. Dis. - Hong Kong. - 1996. - P.188.
41. Reva O.N., Sorokulova I.B., Smirnov V.V. Computerized scheme for identification of bacteria of the genus *Bacillus* and assessment of their biotechnological importance // 9-th International Conference on Bacilli. - Lausanne. - 1997. - P. 28.
42. Rybalko S.L., Shapiro A.W., Antonjak S.N., Dyadun S.T., Sorokulova I.B., Grytsak T.F., Selnikova O.P. Use of eubiotics and carbohydrate-containing bacterial biopolymers for anti-candidiasis vaccine construction // 12th World AIDS Conference - Geneva- 1998. - P. 539.
43. Pinchuk I., Bresslier P., Verneuil B., Sorokulova I.B., Megraud F., Urdaci M. Inhibition of *Helicobacter pylori* by the probiotic strain *Bacillus subtilis* 3, a potentially novel antibiotic producer // Gut. - 1998. - 43, N 2, Suppl. - P. A10-A11.

Сорокулова І.Б. Теоретичне обґрунтування і практика застосування бактерій роду *Bacillus* для конструювання нових пробіотиків. - Рукопис.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора біологічних наук за спеціальністю 03.00.07 - мікробіологія. - Інститут мікробіології і вірусології ім.Д.К.Заболотного НАН України, Київ, 1999.

Дисертацію присвячено питанням розробки принципово нових пробіотиків на основі аеробних спороутворюючих бактерій роду *Bacillus*. Теоретично обґрунтовано і практично реалізовано підходи до створення біопрепаратів з унікальними властивостями. Доведено, що методами генетичної інженерії на основі бацил можна конструювати рекомбінантні пробіотики з заданими параметрами. Проведено весь комплекс доклінічного вивчення біопрепаратів і доведено їх безпечність для макроорганізму. Показано високу ефективність розроблених біопрепаратів при експериментальних бактеріальних і вірусних інфекціях, а також при застосуванні в медицині та ветеринарії. Виявлено нові аспекти механізму дії запропонованих біопрепаратів. Розроблено технологію виробництва препаратів та методи їх контролю. У встановленому порядку затверджено необхідну нормативну документацію, на основі якої здійснюється промисловий випуск розроблених пробіотиків - біоспорину і субаліну.

Ключові слова: аеробні спороутворюючі бактерії роду *Bacillus*, біопрепарати, рекомбінантні пробіотики, експериментальні інфекції, механізм дії пробіотиків.

Сорокулова И.Б. Теоретическое обоснование и практика применения бактерий рода *Bacillus* для конструирования новых пробиотиков. - Рукопись.

Диссертация на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.00.07 - микробиология. - Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К.Заболотного НАН Украины, Киев, 1999.

Диссертация посвящена вопросам разработки принципиально новых пробиотиков на основе аэробных спорообразующих бактерий рода *Bacillus*. Теоретически обоснованы и практически реализованы подходы к созданию биопрепаратов с уникальными свойствами.

На основе двух штаммов бацилл, которые дополняют друг друга по физиолого-биохимическим свойствам и спектру антагонистической активности, сконструирован пробиотик биоспорин. Биоспорин отличается от других зарубежных коммерческих биопрепаратов, базирующихся на аэробных спорообразующих бактериях (бактисубтил, цереобиоген, энерогермин) оригинальным спектром антагонистической активности и высокой степенью безопасности. При изучении клинической эффективности биоспорина в медицинских учреждениях Киева, Москвы, Днепропетровска на разных контингентах больных показана безопасность препарата, его хорошая переносимость, высокая лечебная эффективность. Отмечена полная элиминация сальмонелл и шигелл у всех больных, получавших биоспорин, значительно снижалось количество или полностью элиминировались условно патогенные энтеробактерии, включая патогенную кишечную палочку (у 73,9 и 64% больных соответственно), патогенные стафилококки (у 75% больных) и грибы рода *Candida* (у 75% больных).

Получены флуоресцирующие диагностические сыворотки для иммунофлуоресцентного анализа *B.subtilis* 3 и *B.licheniformis* 31, составляющих основу биоспорина, применение которых обеспечивает надежную экспресс-диагностику подлинности производственных штаммов на всех технологических этапах производства препарата.

В настоящее время биоспорин зарегистрирован в Украине и Российской Федерации, утверждена вся необходимая нормативная документация на биоспорин - Фармакопейная статья (в Украине и Российской Федерации), регламент производства, инструкция по применению препарата.

Промышленный выпуск биоспорина осуществляется ОАО "Днепрофарм" (г.Днепропетровск) и Центром военно-технических проблем бактериологической защиты (г. Екатеринбург) (в соответствии с лицензионным договором с Институтом микробиологии и вирусологии НАН Украины).

Разработаны научные основы конструирования рекомбинантных пробиотиков с заданными параметрами методами генетической инженерии. Трансформацией штамма *B.subtilis*, входящего в состав биоспорина, плазмидной ДНК с геном лейкоцитарного α -2 интерферона человека, получен новый штамм, который наряду с высокой антагонистической активностью в отношении патогенных и условно патогенных микроорганизмов характеризуется антивирусной активностью. Показано, что введенная плазмидная ДНК стабильно сохраняется в рекомбинантном штамме при многочисленных пересевах культуры в питательных средах без селективного давления и при пассажах через организм лабораторных животных. В опытах, проведенных *in vitro* и на лабораторных животных доказано, что плазмидная ДНК не передается другим микроорганизмам - как представителям нормальной микрофлоры, так и патогенным культурам.

Полученный штамм явился основой пробиотика субалина, который не имеет аналогов в мировой практике. Проведен весь комплекс доклинического изучения препарата и в настоящее время заканчиваются клинические испытания эффективности субалина, которые проводятся в соответствии с решением Комитета по вопросам иммунобиологических препаратов МЗ Украины.

Показана высокая эффективность разработанных препаратов при экспериментальных бактериальных и вирусных инфекциях, а также при применении их в медицине и ветеринарии.

Выявлены некоторые новые аспекты механизма действия предложенных биопрепаратов. Показано значение транслокации бактерий, составляющих основу пробиотиков, для стимуляции иммунной резистентности макроорганизма. Установлена также стимуляция специфического иммунного ответа при пероральном применении пробиотиков во время вакцинации.

Ключевые слова: аэробные спорообразующие бактерии рода *Bacillus*, биопрепараты, рекомбинантные пробиотики, экспериментальные инфекции, механизм действия пробиотиков.

Sorokulova I.B. Theoretical basis and practice for use of the *Bacillus* genus bacteria for the construction of new probiotics. - Manuscript.

Thesis for a doctor's degree by speciality 03.00.07 - microbiology. - Institute of Microbiology and Virology of National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, 1999.

The dissertation is devoted to elaboration of principally new probiotics on the base of the aerob spore-forming bacteria of the *Bacillus* genus. New approaches to the creation of biopreparations with unique properties were theoretically based and practically carried out. The possibility to construct the recombinant probiotics with planned properties by the methods of genetical engineering has been proved. Preclinical safety evaluation of new probiotics has been realized. The high efficacy of probiotics has been shown in experimental bacterial and viral infections and during their use in medicine and veterinary. New aspects of probiotic action have been discovered. The technology of production and the methods of the biopreparations control were elaborated. All necessary documentation for the production of probiotics - biosporin and subalin - was maintained.

Key words: aerob spore-forming bacteria of the *Bacillus* genus, biopreparations, recombinant probiotics, experimental infections, mechanism of probiotic's action.